

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A MEMÓRIA E SOBRE
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E MOLECULARES NO HIPOCAMPO E NO
MÚSCULO DE RATOS SENESCENTES**

CLÁUDIA VANZELLA

Porto Alegre

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A MEMÓRIA E SOBRE
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E MOLECULARES NO HIPOCAMPO E NO
MÚSCULO DE RATOS SENESCENTES**

CLÁUDIA VANZELLA

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto

Co-orientadora: Profa. Dra. Angela Terezinha de Souza Wyse

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas –
Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito
parcial para a obtenção do grau de Doutora em Bioquímica

Porto Alegre

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Vanzella, Cláudia

Efeitos do exercício físico moderado sobre a memória e sobre parâmetros bioquímicos e moleculares no hipocampo e no músculo de ratos senescentes / Cláudia Vanzella. -- 2017.

118 f.

Orientador: Carlos Alexandre Netto.

Coorientadora: Angela Terezinha de Souza Wyse.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. exercício físico. 2. envelhecimento. 3. estresse oxidativo. 4. fatores neurotróficos. 5. enzimas Na⁺,K⁺-ATPase e AChE. I. Netto, Carlos Alexandre, orient. II. de Souza Wyse, Angela Terezinha, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dedicatória

*Dedico esta Tese àqueles que me deram a vida e não mediram esforços para que eu pudesse realizar este sonho, meus queridos pais
Cláudio e Odila!*

AGRADECIMENTOS

À Deus que é esta força maior, que me ampara, me dá forças e me ilumina nos momentos mais difíceis.

Ao meu querido orientador Prof. Alex, obrigada por ter me aceitado no seu grupo de pesquisa. Agradeço pelos inúmeros ensinamentos, pelo exemplo, pelo conhecimento compartilhado e por me fazer entender que tudo tem o seu tempo.

À minha co-orientadora Profa. Angela, pelo exemplo de dedicação e paixão pela bioquímica que levarei sempre comigo. Obrigada pelos “bons fluidos”!

À todos os colegas e amigos do laboratório de Isquemia Cerebral, muito obrigada! Meu agradecimento especial ao Eduardo, pelo auxílio e ensinamentos com o Water maze, pela amizade e paciência. Ao Fabrício (Fafa) e ao Felipe (Fifi), que me estenderam a mão em momentos muito importantes relacionados aos artigos, obrigada, sem vocês tudo teria sido muito mais difícil! A Luz Elena, que se tornou uma grande amiga, por quem tenho muita admiração pela força, determinação e competência, que me ajudou muito também com as estatísticas, obrigada! A Janine, pela amizade e carinho, pelo ombro amigo nos momentos difíceis.

Aos colegas do lab 36! Agradeço Jana, Aline e Tiago pelos experimentos, mas em especial a Jana pela contribuição com ideias, auxílio e discussão dos resultados.

À Adri, pelas colaborações, discussão de resultados e pela amizade! Foi muito bom poder contar contigo.

À família. Aos meus pais, Cláudio e Odila, que jamais mediram esforços para me dar àquilo que jamais alguém poderá me roubar: meus estudos! Ao meu irmão, Arthur, obrigada pelo apoio e carinho sempre! Obrigada por acreditarem em mim e por terem embarcado neste sonho comigo e, acima de tudo, por acreditarem que um dia eu chegaria lá! Amo MUITO vocês!

Ao meu amor, meu companheiro e porto seguro, Ernani! Muito obrigada por me apoiar e estar sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida! Te amo!

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, em especial a Cléia,
sempre muito prestativa.

Aos funcionários do biotério por tornarem nossas pesquisas viáveis.

À CAPES pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| APRESENTAÇÃO | vi |
| LISTA DE FIGURAS | vii |
| LISTA DE TABELAS | x |
| LISTA DE ABREVIATURAS | xi |
| RESUMO | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| 1. INTRODUÇÃO | 3 |
| 1.1 Envelhecimento | 4 |
| 1.2 Exercício Físico | 10 |
| 1.2.1 Exercício Físico e Memória | 13 |
| 2. OBJETIVOS | 21 |
| 2.1 Objetivo Geral | 22 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 22 |
| 3. CAPÍTULO I | 23 |
| Artigo: Treadmill running prevents age-related memory deficit and alters neurotrophic factors and oxidative damage in the hippocampus of Wistar rats – submetido | |
| 4. CAPÍTULO II | 49 |
| Manuscrito: Forced treadmill exercise prevents spatial memory deficits in aged rats probably through the activation of Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase in the hippocampus – publicado no periódico <i>Neurochemical Research</i> | |
| 5. CAPÍTULO III | 58 |
| Efeito do exercício físico sobre o estado oxidativo celular no músculo esquelético (sóleo) de ratos Wistar machos de 3 e 22 meses de idade. | |
| 6. DISCUSSÃO | 79 |
| 7. CONCLUSÕES | 91 |
| 8. PERSPECTIVAS | 94 |
| 9. BIBLIOGRAFIA | 96 |

APRESENTAÇÃO

Esta tese está organizada em tópicos, a saber: **Introdução, Objetivos, Capítulos 1 a 3, Discussão, Conclusões, Perspectivas e Bibliografia.**

A **Introdução** apresenta o embasamento teórico que nos levou a formular a proposta de trabalho. Os **Objetivos** – geral e específicos – estão dispostos no corpo da tese e em maiores detalhes inseridos dentro de cada trabalho. Os **Capítulos** contêm os resultados apresentados na forma de trabalhos publicados em inglês (capítulo 1 - manuscrito submetido, capítulo 2 – artigo publicado), e os resultados referentes ao terceiro objetivo são apresentados em português.

O tópico **Discussão** apresenta uma interpretação geral dos resultados obtidos nos diferentes trabalhos. Nas seções **Conclusões e Perspectivas** são apresentadas as conclusões da tese e algumas possibilidades de futuros trabalhos a partir dos resultados obtidos.

A **Bibliografia** contém somente as referências dos trabalhos citados nos tópicos **Introdução, Capítulo 3 e Discussão.**

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

| | |
|---|----|
| Figura 1. Representação esquemática do estresse oxidativo celular | 6 |
| Figura 2. Desenho esquemático da formação de espécies reativas nas células | 7 |
| Figura 3. Hormese e exercício | 15 |
| Figura 4. Efeito do exercício sobre o aprendizado através da cascata de fatores de crescimento | 18 |

CAPÍTULO I

| | |
|---|----|
| Figura 1. Desenho experimental | 39 |
| Figura 2. Efeito do envelhecimento e do exercício sobre a latência para encontrar a plataforma durante as cinco sessões de treino na tarefa de memória de referência no Water maze | 40 |
| Figura 3. Efeito do envelhecimento e do exercício sobre (A) conteúdo de radicais livres, (B) lipoperoxidação e (C) razão SOD/CAT | 41 |
| Figura 4. Efeito do envelhecimento e do exercício sobre a expressão de (A) BDNF, (B) NT-3, (C) IFG-I e (D) VEGF. | 44 |

CAPÍTULO II

| | |
|---|----|
| Figura 1. Desenho experimental | 52 |
| Figura 2. Efeito do envelhecimento e do exercício sobre a latência para encontrar a plataforma durante as cinco sessões de treino na tarefa de memória de referência no Water maze | 53 |
| Figura 3. Efeito do envelhecimento e do exercício sobre o desempenho da memória de trabalho no Water maze | 53 |
| Figura 4. Efeito do envelhecimento, do treinamento cognitivo e do exercício combinado com o treinamento cognitivo sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase no hipocampo de ratos | 54 |

Figura 5. Correlações encontradas para os ratos envelhecidos: (A) 54
correlação entre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase e a memória de
referência e (B) correlação entre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase e a
memória de trabalho.

Figura 6. Efeito do envelhecimento, do treinamento cognitivo e do 55
exercício combinado com o treinamento cognitivo sobre a atividade da
AChE no hipocampo de ratos

CAPÍTULO III

Figura 1. Desenho experimental 63

Figura 2. Efeito do exercício de corrida em esteira sobre o conteúdo de 69
espécies reativas no músculo sóleo de ratos de 3 e 22 meses de idade

Figura 3. Efeito do exercício de corrida em esteira sobre a 70
lipoperoxidação no músculo sóleo de ratos de 3 e 22 meses de idade

Figura 4. Efeito do exercício de corrida em esteira sobre o conteúdo de 70
sulfidrilas no músculo sóleo de ratos de 3 e 22 meses de idade

Figura 5. Efeito do exercício de corrida em esteira sobre o conteúdo de 71
proteínas carboniladas no músculo sóleo de ratos de 3 e 22 meses de
idade

Figura 6. Efeito do exercício de corrida em esteira sobre a atividade da 72
SOD no músculo sóleo de ratos de 3 e 22 meses de idade

Figura 7. Efeito do exercício de corrida em esteira sobre a atividade da 73
CAT no músculo sóleo de ratos de 3 e 22 meses de idade

Figura 8. Efeito do exercício de corrida em esteira sobre a atividade da 73
GPx no músculo sóleo de ratos de 3 e 22 meses de idade

DISCUSSÃO

Figura 5. Efeito do envelhecimento e do exercício físico sobre a 87
memória, parâmetros de estado oxidativo celular, expressão de fatores
neurotróficos e atividade das enzimas AChE e Na^+, K^+ ATPase no
hipocampo de ratos de 3 (jovens) e 22 meses (senescentes) de idade
(LPO; lipoperoxidação)

Figura 6. Efeito do envelhecimento e do exercício físico sobre 89
parâmetros de estado oxidativo celular no hipocampo e no músculo
sóleo de ratos de 3 (jovens) e 22 meses (senescentes) de idade (LPO;
lipoperoxidação)

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Efeito do envelhecimento sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase e AChE no hipocampo de ratos naïve | 54 |
|---|----|

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh: acetilcolina

AChE: acetilcolinesterase

AO: antioxidante

BHE: barreira hematoencefálica

BDNF: fator neurotrófico derivado do encéfalo

CAT: catalase

DCF: 2'7'-diclorofluoresceína

DTNB: 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico)

EXE: exercitado

GPx: Glutathione peroxidase

GSH: glutathione

GSSH: glutathione oxidada

HCl: ácido clorídrico

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

H₂DCF: 2'7'-dicloro-diidro-fluoresceína

H₂DCF-DA: diacetato de 2'7'-dicloro-diidro-fluoresceína

IGF-1: fator de crescimento semelhante a insulina-1

KCl: cloreto de potássio

MDA: malondialdeído

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

Na⁺,K⁺-ATPase: adenosina trifosfatase de sódio e potássio

Sistema NE: sistema noradrenérgico

NMDA: N-metil D-aspartato

NT-3: neurotrofina-3

NO: óxido nítrico

O₂^{-•}: radical ânion superóxido

OH[•]: radical hidroxila

RL: radicais livres

ROS: espécies reativas de oxigênio

SED: sedentário

SOD: superóxido dismutase

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

VO₂ máx: consumo máximo de oxigênio

RESUMO

O envelhecimento é um processo no qual ocorrem alterações estruturais e funcionais da maioria dos órgãos, que podem levar ao aumento da susceptibilidade a várias doenças associadas à idade. Assim, várias estratégias têm sido investigadas a fim de se reduzir os sintomas relacionados à idade e o exercício físico tem demonstrado efeito neuroprotetor em diferentes modelos experimentais. Nesta tese, investigamos os efeitos do exercício físico moderado sobre a memória e sobre parâmetros bioquímicos no hipocampo e no músculo sóleo de ratos Wistar de 3, 6 e 22 meses de idade. Para isso, foram realizados três experimentos distintos que deram origem aos três capítulos apresentados na tese. No primeiro experimento, estudamos o efeito do exercício físico em ratos de 3 e 22 meses de idade. Neste experimento, o exercício preveniu o déficit de aquisição da memória de referência relacionado à idade. Além disso, preveniu o aumento do estresse oxidativo no hipocampo de ratos envelhecidos e também promoveu o aumento da expressão dos fatores neurotróficos BDNF, NT-3 e IGF-1 no hipocampo destes animais. É importante ressaltar que houve uma correlação positiva entre a redução do estresse oxidativo e a latência para encontrar a plataforma no 5º dia de treino na tarefa de memória de referência, ou seja, a redução do conteúdo de espécies reativas e da lipoperoxidação pelo exercício está correlacionada com a melhora do desempenho de memória dos ratos envelhecidos. No segundo experimento, avaliamos o efeito do exercício físico em ratos de 3, 6 e 22 meses de idade. Corroborando com os resultados apresentados no experimento anterior, foi demonstrado que o exercício físico moderado preveniu os déficits de memória espacial de referência e de trabalho relacionados à idade. O treinamento cognitivo no Water maze aumentou a atividade das enzimas Na^+, K^+ -ATPase e AChE no hipocampo de ratos adultos e envelhecidos. O aumento na atividade da Na^+, K^+ -ATPase foi ainda maior nos ratos envelhecidos submetidos ao exercício físico combinado com o treinamento cognitivo. Além disso, foi observada uma correlação positiva entre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase no hipocampo dos ratos envelhecidos exercitados e a latência para encontrar a plataforma no 5º dia de treino na tarefa de memória de referência, ou seja, o aumento da atividade da Na^+, K^+ -ATPase está associado com a melhora do desempenho de memória relacionado ao exercício físico. De acordo com esses dados, também foi observada uma correlação negativa entre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase e a diferença (Δ) entre a média das latências entre os trials 1 e 4 na tarefa de memória de trabalho, o que demonstra que os ratos envelhecidos exercitados apresentaram um melhor desempenho na tarefa de memória de trabalho associado com o aumento na atividade da Na^+, K^+ -ATPase. No terceiro experimento, investigamos o efeito do exercício físico em ratos de 3 e 22 meses de idade. O exercício aumentou o conteúdo de espécies reativas e a lipoperoxidação no músculo sóleo de ratos jovens. Ratos envelhecidos apresentaram um aumento da lipoperoxidação e uma redução na atividade da enzima catalase. O exercício induziu um aumento dos níveis de espécies reativas, uma redução no conteúdo de sulfidrilas e o aumento de proteínas carboniladas; contudo, promoveu o aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase no sóleo dos ratos envelhecidos. Assim, os resultados do primeiro e do segundo experimento demonstram que o exercício físico preveniu o declínio da memória espacial relacionado à idade e que esse efeito pode ser mediado por fatores que incluem a redução do estresse oxidativo, o aumento da expressão de fatores neurotróficos e o aumento da atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase no hipocampo de ratos envelhecidos. Os resultados do músculo demonstram que o sóleo dos ratos jovens, embora susceptível ao aumento das espécies reativas e lipoperoxidação, não apresentou dano às proteínas, sugerindo que outros mecanismos, como o sistema de defesa antioxidante não enzimático, possam estar atuando para compensar os efeitos do exercício. Além disso, o músculo dos ratos envelhecidos parece ser mais sensível que o dos ratos jovens às alterações do estado oxidativo celular induzidas pelo exercício físico, porque apesar dos animais envelhecidos exercitados apresentarem um aumento na atividade das enzimas antioxidantes, não houve uma redução do dano oxidativo.

Palavras-Chave: exercício físico, envelhecimento, ratos, estresse oxidativo, fatores neurotróficos, enzimas Na^+, K^+ -ATPase e AChE.

ABSTRACT

Aging is a process in which structural and functional changes occur in most organs and may lead to increased susceptibility to various age-related diseases. Several approaches have been investigated with the aim of reducing age-related symptoms and physical exercise is a therapeutic strategy that has presented neuroprotective action in different experimental models. In this context, some studies show that regular physical exercise is related to the improvement of quality of life and to the prevention of age-related cognitive decline. In the present thesis, we investigated the effect of moderate physical exercise on memory and on biochemical parameters in the hippocampus and soleus muscle in 3, 6 and 22 months-old rats. For that, three different experiments were carried out, which gave rise to the three chapters presented in this thesis. In the first experiment, we studied the effect of physical exercise in 3 and 22 months-old rats. In this experiment, the exercise prevented the age-related acquisition deficit of reference memory. In addition, exercise prevented the increased in oxidative stress and also was able to increase the expression of neurotrophic factors BDNF, NT-3 and IGF-1 in the hippocampus of aged rats. It is important to note that there was a positive correlation between the reduction of oxidative stress and latency to find the platform on the 5th day of training in the reference memory task, i.e., reduction of reactive species levels and lipid peroxidation, might be associated with the exercise-related memory improvement. In the second experiment, we evaluated the effect of physical exercise in 3, 6 and 22 months-old rats. Corroborating with the results presented in the previous experiment, it was demonstrated that moderate physical exercise prevented age-related spatial reference and working memory deficits. It has also been shown that the cognitive training in Water maze increased the activity of the Na⁺,K⁺-ATPase and AChE enzymes in the hippocampus of adult and aged rats. The increase in Na⁺,K⁺-ATPase activity was even further increased in aged rats that were submitted to physical exercise combined with cognitive training. In addition, a positive correlation was observed between the Na⁺,K⁺-ATPase activity in the hippocampus of aged exercised rats and the latency to find the platform on the 5th day of training in the reference memory task, i.e., the increase in Na⁺,K⁺-ATPase activity is associated with the exercise-related memory improvement in aged rats. Consistently, a negative correlation between the Na⁺,K⁺-ATPase activity and the difference (delta) between the mean latencies of trials 1 and 4 in the working memory task was also found, i.e., the exercised aged rats showed better performance in the working memory task associated with the increase in Na⁺,K⁺-ATPase activity. In the third experiment, we investigated the effect of physical exercise in 3 and 22 months-old rats. Exercise increased the reactive species content and lipid peroxidation in soleus muscle of young rats. Aged rats showed an increase in lipid peroxidation and a reduction in the catalase activity. Exercise induced an increase in reactive species levels, a reduction in sulfhydryl content and an increase in carbonyl proteins; however, the exercise was able to increase the superoxide dismutase and catalase activities in the soleus of aged rats. Thus, the results of first and second experiments demonstrate that physical exercise prevents the age-related decline of spatial memory and this effect might be related to the reduction of oxidative stress, increased expression of neurotrophic factors and the increase in the Na⁺,K⁺-ATPase activity in the hippocampus of aged rats. The muscle results demonstrate that soleus of young rats, although susceptible to the increased in reactive species and lipid peroxidation, showed no damage to proteins, suggesting that other mechanisms, such as the non-enzymatic antioxidant defense system, may be acting to compensate the effects of exercise. In addition, the muscle of the aged rats seems to be more sensitive than the young rats to changes in the cellular oxidative state induced by exercise, since aged exercised animals showed an increase in the activity of antioxidant enzymes, but there was no reduction of oxidative damage. **Key-words:** physical exercise, aging, rats, oxidative stress, neurotrophic factors, Na⁺,K⁺-ATPase and AChE enzymes.

1. INTRODUÇÃO

1. Envelhecimento

O envelhecimento é um processo biológico complexo caracterizado pelo declínio gradual e progressivo das funções fisiológicas e bioquímicas da maioria dos órgãos, podendo levar ao aumento da susceptibilidade a várias doenças associadas à idade (Paradies *et al.*, 2011; Bo *et al.*, 2013). No Brasil, estima-se que em 50 anos aproximadamente 30% da população estará na faixa etária acima dos 65 anos (IBGE, 2008). Estes dados são relevantes, uma vez que demonstram a importância da pesquisa sobre o envelhecimento, com vistas a contribuir para uma melhor qualidade de vida na terceira idade.

Embora o envelhecimento seja frequentemente acompanhado de condições fisiopatológicas, muitos indivíduos envelhecem sem desenvolver qualquer patologia significativa (Depp e Jeste, 2006). Contudo, mesmo nesses casos há um declínio relativo de várias funções psicofisiológicas, que incluem os processos cognitivos como aprendizado e memória (Aine *et al.*, 2010).

As alterações fisiológicas e estruturais que ocorrem no cérebro durante o envelhecimento podem levar a diferentes graus de declínio cognitivo (Migliore e Coppèdè, 2009). Estudos em seres humanos demonstraram que a memória espacial é uma das principais habilidades cognitivas afetada durante o envelhecimento (Hölscher, 2003). A memória espacial é importante para situar o indivíduo em relação ao seu ambiente por meio da formação de uma representação cognitiva imediata do espaço. Este mapa cognitivo é construído pelo hipocampo, que incorpora os detalhes relativos à velocidade e direção do movimento, assim como a informação relacionada ao espaço e aos objetos (O'Keefe e Nadel, 1979; Hölscher, 2003). Enquanto os indivíduos envelhecidos podem lembrar-se da quantidade de itens em uma tarefa de memória espacial, eles apresentam déficits na contextualização espacial destes itens, o que

demonstra que a ativação do hipocampo e das estruturas cerebrais relacionadas durante esta tarefa de navegação espacial está atenuada em indivíduos envelhecidos (Moffat *et al.*, 2006; Kukulja *et al.*, 2009).

Estudos em roedores também demonstram que o envelhecimento está relacionado com um pior desempenho em tarefas de memória, tanto em tarefas espaciais, como o labirinto aquático de Morris (Zhang *et al.*, 2012; Haider *et al.*, 2014; Taridi *et al.*, 2014) quanto em tarefas aversivas, como a esQUIVA inibitória (Lovatel *et al.*, 2013; Bertoldi *et al.*, 2017).

A hipótese dos radicais livres e do estresse oxidativo tem sido muito estudada nos últimos anos entre as possibilidades para explicar o processo de envelhecimento (Harman, 1956; Tiana *et al.*, 1998; Liochev, 2013) (Figura 1) e vários estudos em animais experimentais demonstram que o aumento da idade é acompanhado pelo desequilíbrio entre a produção dos radicais livres e as defesas antioxidantes teciduais (Sanz *et al.*, 1997; Floyd e Hensley, 2002; Savitha *et al.*, 2005). Conceitualmente, **radicais livres** são moléculas que apresentam um elétron desemparelhado no seu orbital mais externo, o que faz com que sejam substâncias altamente instáveis e reativas (Halliwell, 1991, 2012). Muitas espécies reativas são centradas no oxigênio e por isso denominadas de **espécies reativas de oxigênio (EROS)**, que podem ser um radical livre, como o radical hidroxila (OH), ou podem ser outras substâncias reativas que não são radicais livres, como é o caso do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Gomes *et al.*, 2012). Por outro lado, um **antioxidante** é definido como uma molécula responsável por neutralizar os efeitos de um radical livre ou de uma espécie reativa, doando um elétron para esta molécula e estabilizando-a, sem tornar-se um radical livre (Vannucchi *et al.*, 1998). O organismo dos mamíferos possui antioxidantes não-enzimáticos, como as vitaminas C e E, por

exemplo, e antioxidantes enzimáticos, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Quando há um desequilíbrio entre a geração de radicais livres e a atividade do sistema de defesa antioxidante, ocorre o estresse oxidativo, fenômeno envolvido em muitos processos patológicos (Betteridge, 2000; Evans *et al.*, 2000; Halliwell, 2012).

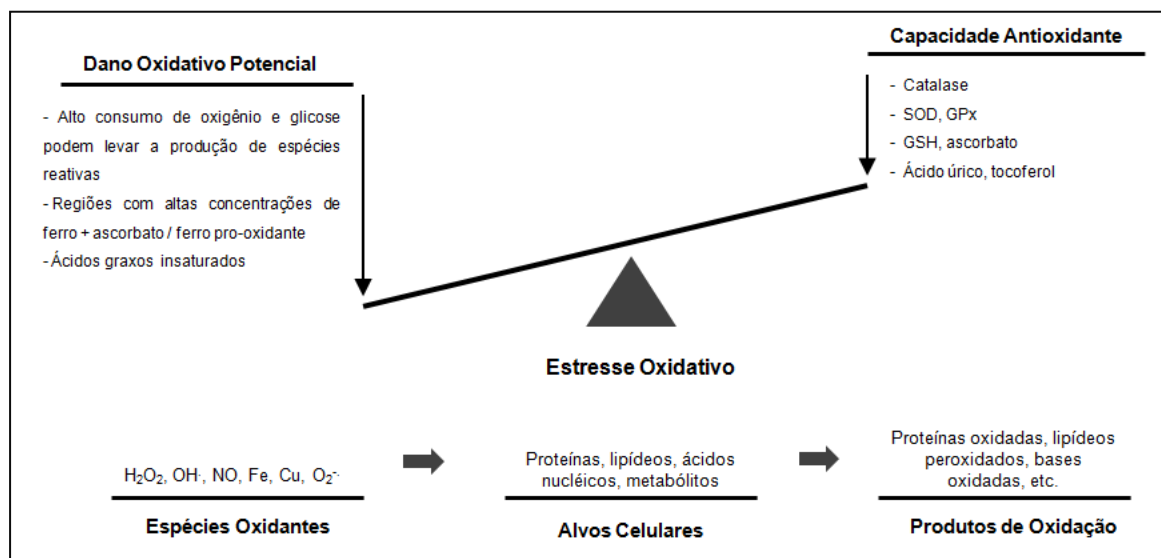


Figura 1. Representação esquemática do estresse oxidativo celular. As espécies oxidantes são produzidas e interagem com os alvos celulares gerando produtos de oxidação única e estes, em alguns casos, causam estresse oxidativo nos tecidos. H_2O_2 , peróxido de hidrogênio; OH^\cdot , radical hidroxila; NO , óxido nítrico, Fe , ferro; Cu , cobre; $O_2^{\cdot-}$, radical ânion superóxido; SOD, superóxido dismutase, GPx, glutathione peroxidase; GSH, glutathione (**Adaptado de** Floyd e Hensley, 2002).

O **estresse oxidativo** também está relacionado com declínio de memória associado à idade (Pietá Dias *et al.*, 2007). O cérebro é particularmente susceptível aos efeitos das espécies reativas (Figura 2), devido à sua alta taxa metabólica e sua capacidade de regeneração celular diminuída em relação aos outros órgãos. Isto, somado com a redução das defesas antioxidantes e dos mecanismos de reparo durante o envelhecimento, resulta no acúmulo de dano oxidativo, o que pode levar ao aparecimento de doenças

neurodegenerativas. Além disso, existem interações entre o estresse oxidativo e outros mecanismos moleculares que podem causar neurodegeneração, como a ativação de células gliais, disfunção mitocondrial e morte celular programada (Andersen, 2004; Martin e Grotewiel, 2006; Jurgens e Johnson, 2012).

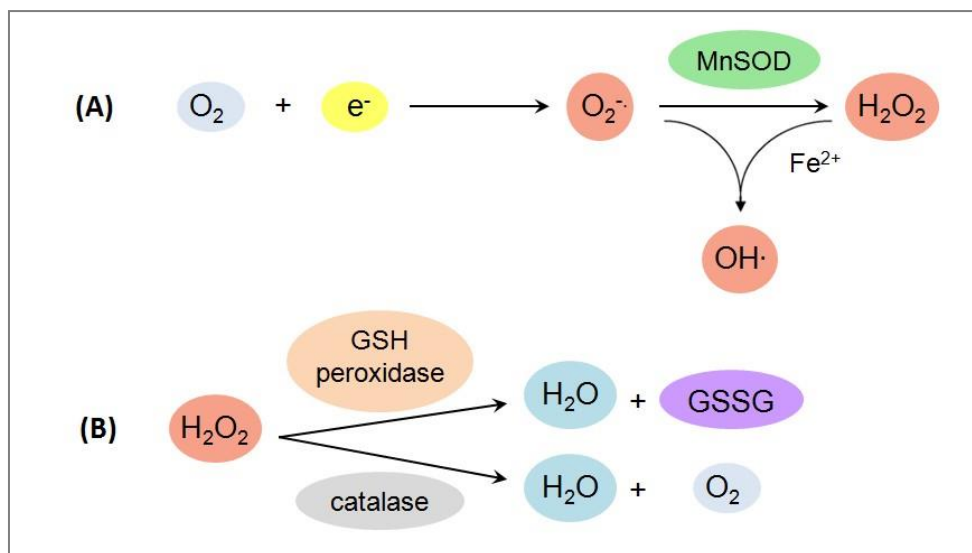


Figura 2. Desenho esquemático da formação de espécies reativas nas células. (A) Formação do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a partir de oxigênio (O_2) e elétrons de alta energia. O $O_2^{\cdot-}$ pode ser convertido pela superóxido dismutase (MnSOD) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou pela reação de Fenton, na presença de ferro (Fe^{2+}), em radical hidroxila (OH^{\cdot}). (B) Decomposição do H_2O_2 em água (H_2O) e $O_2^{\cdot-}$ pela enzima catalase e em H_2O e glutatona oxidada (GSSG) pela enzima glutatona peroxidase (GSH peroxidase). (Adaptado de Migliore e Coppedè, 2009).

O **hipocampo** é uma estrutura fundamental para funções cognitivas como aprendizado e memória, e parece ser particularmente vulnerável ao envelhecimento (Serrano e Klann, 2004; Bartsch e Wulff, 2015). Assim, o seu funcionamento adequado depende da atividade de enzimas de membrana que também demonstram ter função importante para a cognição. A **Na^+,K^+ -ATPase** é uma enzima transmembrana essencial, responsável pela manutenção do gradiente eletroquímico através da membrana celular. Além desta função,

alguns estudos têm demonstrado que essa enzima exerce influência sobre o processamento de memória (Wyse *et al.*, 2004; dos Reis-Lunardelli *et al.*, 2007; Morth *et al.*, 2011). Por exemplo, foi relatado que ratos submetidos a um modelo experimental de hiperargininemia, um erro inato do metabolismo do ciclo da uréia, apresentaram uma redução na atividade hipocampal da enzima Na^+, K^+ -ATPase e também um declínio significativo na tarefa de memória aversiva, sugerindo um possível envolvimento desta enzima com o processo de aprendizado e memória (Dos Reis *et al.*, 2002). Apesar destas evidências, poucos estudos investigaram a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase no cérebro durante o envelhecimento e ainda, quando investigaram, avaliaram a atividade da enzima no cérebro total e não em uma estrutura cerebral específica (Fraser *et al.*, 2001; Carageorgiou *et al.*, 2008).

O **sistema colinérgico** é o principal sistema neurotransmissor envolvido nos sintomas cognitivos da demência e possivelmente do envelhecimento (Bartus *et al.*, 1982; Schliebs e Arendt, 2011); as evidências indicam haver uma depleção múltipla e difusa de vários marcadores bioquímicos em neurônios colinérgicos (Meneses, 1999; Peters, 2006; Lee *et al.*, 2010). Além disso, tem sido demonstrado que o declínio da função colinérgica relacionado à idade pode ser parcialmente responsável pelos déficits de memória de curto (Haider *et al.*, 2014) e de longo prazo (Papandreou *et al.*, 2011) em roedores. Assim, alguns trabalhos demonstraram que há uma redução na atividade da enzima **acetilcolinesterase (AChE)** relacionada com a idade em estruturas cerebrais de roedores (Carageorgiou *et al.*, 2008; Jolitha *et al.*, 2009; Haider *et al.*, 2014). Neste contexto, também foi relatado que a síntese e liberação de acetilcolina, a captação de colina e a densidade dos receptores colinérgicos diminuem com o

envelhecimento, o que pode explicar pelo menos em parte a redução na atividade da AChE (Gibson e Peterson, 1981; Araujo *et al.*, 1990).

As alterações induzidas pelo envelhecimento ocorrem em diversos sistemas fisiológicos. Desta forma, alguns estudos demonstram que o **tecido muscular** também é alvo destas alterações, sendo a principal delas conhecida como sarcopenia do envelhecimento, uma condição associada com declínio progressivo da massa, da força e da função do músculo esquelético em seres humanos (Mitchell *et al.*, 2012). A sarcopenia pode privar o indivíduo de sua independência, afetando sua qualidade de vida e causando dificuldades para realização das tarefas diárias, além de aumentar o risco de quedas bruscas e fraturas (Szulc *et al.*, 2005).

Estudos em seres humanos demonstraram que a redução da massa muscular durante o envelhecimento parece ser decorrente de vários fatores, incluindo atrofia de fibras do tipo II (Hunter *et al.*, 2004), inatividade física (Doherty, 2003; Macaluso e De Vito, 2004) alterações do estado hormonal, diminuição da ingestão calórica e proteica, aumento de mediadores inflamatórios e alteração da síntese de várias proteínas (Doherty, 2003).

Apesar da perda da função do músculo esquelético não ser totalmente compreendida, estudos em roedores sugerem o forte envolvimento do aumento do estresse oxidativo (Szczesny *et al.*, 2010). Neste sentido, foi relatado que durante o envelhecimento há um aumento de espécies reativas no músculo esquelético (Jackson, 2011), o que pode estar associado com a redução da captação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (Capel *et al.*, 2005); assim o aumento do cálcio intracelular leva não apenas ao aumento de espécies reativas, mas também a oxidação de proteínas musculares e a liberação de fatores apoptóticos (Orrenius *et al.*, 2003).

No que se refere a idade equivalente entre seres humanos e roedores, mais especificamente a espécie *Rattus norvegicus*, de acordo com Sengupta (2013), 1 ano de idade para seres humanos é equivalente a 13,8 dias para ratos. No entanto, este cálculo pode ser usado apenas em certas fases da vida do rato, pois eles têm uma infância breve e acelerada em relação aos seres humanos, tornando-se sexualmente maduros às 6 semanas de idade, o que difere dos humanos, que desenvolvem-se lentamente e não atingem a puberdade até 11-12 anos de idade. Os ratos atingem sua idade adulta aos 6 meses e podem ser considerados envelhecidos com 24 meses, o equivalente a 60 anos para humanos. Nesta tese, utilizamos ratos de 22 meses de idade como grupo senescente; contudo, considerando o tempo de duração dos experimentos até a eutanásia, os mesmos chegaram próximos aos 24 meses de idade.

2. Exercício Físico

O **exercício físico** é uma abordagem não farmacológica que favorece a saúde e o bem-estar e traz benefícios psicológicos, proporciona integração social, melhora a autoestima (Duman, 2005; Reid *et al.*, 2010), bem como promove a redução do risco de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas associadas à idade em seres humanos (Scarmeas *et al.*, 2009). Além disso, outro ponto que merece destaque é o fato de que a atividade física tem sido considerada uma das estratégias mais acessíveis e importantes para proteger a função cerebral da população em geral (Weuve *et al.*, 2004; Kramer e Erickson, 2007).

Em modelos experimentais foi demonstrado que a atividade física melhora a capacidade cognitiva em ratos envelhecidos (Sampedro-Piquero *et*

all., 2013), atenua os déficits motores, melhora as disfunções neurológicas em diferentes processos neurodegenerativos e atenua a perda neuronal associada à idade (Larsen *et al.*, 2000). Outros estudos também demonstraram que o exercício físico apresenta efeitos benéficos como a melhora da função cerebrovascular, além de promover o aumento da neurogênese, da plasticidade e da secreção de fatores de crescimento (Cotman e Engesser- Cersar, 2002; Zhang *et al.*, 2012).

O exercício físico também promove benefícios metabólicos e adaptações funcionais no **músculo esquelético** durante o envelhecimento em roedores (Tromm *et al.*, 2016). O **sóleo**, um músculo que apresenta uma grande proporção de fibras do tipo I, é um dos músculos mais utilizados durante o exercício de corrida em esteira e apresenta alta atividade de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (Powers *et al.*, 1994), sendo um bom modelo para o estudo das alterações fisiológicas induzidas pelo treinamento físico em ratos jovens e envelhecidos (Lambertucci *et al.*, 2007).

Foi demonstrado que em seres humanos o treinamento físico melhora a capacidade física contrátil, a síntese de proteínas (Balagopal *et al.*, 2001) e a função mitocondrial (Menshikova *et al.*, 2007). O exercício de resistência é recomendado para o tratamento e prevenção da sarcopenia, proporcionando uma melhora significativa na função do músculo esquelético em pacientes idosos, tais como a velocidade de marcha e a capacidade de executar tarefas diárias (Frontera *et al.*, 2000; Braith *et al.*, 2006).

É importante ressaltar que as respostas fisiológicas associadas ao exercício físico dependem do protocolo de treinamento utilizado, que pode variar de acordo com o tipo de motivação (forçado ou voluntário), com a

intensidade do esforço (leve, moderado ou intenso), com a duração (tempo por sessão) e com a frequência com que é realizado (por exemplo, diário, três vezes por semana, etc) (Narath *et al.*, 2001).

No ambiente experimental, o protocolo de treinamento forçado consiste em sessões de corrida em esteira ergométrica ou de nado forçado (Radák *et al.*, 2001), enquanto o livre acesso a uma roda de corrida é considerado um exercício físico voluntário (Russell *et al.*, 1987). Vários trabalhos têm demonstrado diferentes respostas, dependendo do protocolo de treinamento utilizado (Narath *et al.*, 2001; Ang e Gomez-Pinilla, 2007). Tanto o exercício voluntário quanto o forçado têm sido utilizados para investigar os efeitos da atividade física sobre a função cerebral e sobre o músculo esquelético; no entanto, tem-se argumentado que o exercício forçado é mais consistente, uma vez que todos os animais são submetidos às mesmas condições experimentais (Moraska *et al.*, 2000).

Quanto a intensidade do esforço, o exercício físico pode ser classificado como leve, moderado ou intenso, de acordo com o consumo máximo de oxigênio (VO_2 máx), que representa a capacidade máxima que o organismo de um indivíduo tem para captar e utilizar o oxigênio do ar que está inspirando para gerar trabalho. Assim, o teste do VO_2 máx é um instrumento bastante utilizado para a prescrição e orientação de programas de exercício físico. Um exercício leve corresponde entre 30 a 49% do VO_2 máx, um exercício moderado entre 50 a 74%, enquanto que um exercício é considerado intenso acima de 75% do VO_2 máx (American College of Sports Medicine, 1998). Embora a intensidade do esforço seja determinada de acordo com objetivo de cada estudo, cabe destacar que o exercício moderado tem demonstrado uma melhor ação neuroprotetora quando comparado àqueles de maior intensidade (Scopel *et al.*,

2006).

Nesta tese, utilizamos o protocolo de **exercício forçado** em esteira ergométrica adaptada para ratos e de **intensidade moderada** (60% do VO₂ máx), com duração de 20 minutos por dia e frequência de 3 vezes por semana durante um período total de 4 semanas. Esse protocolo de exercício foi selecionado em função dos resultados obtidos em outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa (Ben *et al.*, 2009; Cechetti *et al.*, 2012).

1.2.1 Exercício físico e memória

Várias evidências apoiam a ideia de que a atividade física pode compensar o declínio cognitivo que ocorre na idade adulta avançada (Raz *et al.*, 2005). Desta forma, dados de estudos epidemiológicos demonstraram que a atividade física está associada com a melhora da função cognitiva em indivíduos envelhecidos (Ahlskog *et al.*, 2011) e pode estar correlacionada com alterações estruturais no cérebro (Erickson *et al.*, 2009).

No estudo realizado por Van Praag e colaboradores (2005) foi relatado que camundongos envelhecidos que foram sedentários até os 18 meses de idade e então expostos ao exercício físico voluntário, apresentaram melhora significativa do desempenho cognitivo quando comparados aos controles de mesma idade. Kim e colaboradores (2010) também demonstraram que o exercício forçado de corrida em esteira ergométrica melhorou a memória de curta duração e a memória espacial em ratos senescentes pelo aumento da neurogênese e pela supressão da apoptose no giro denteado.

Outros estudos em roedores demonstram que o exercício físico facilita a aquisição e a retenção da memória em várias tarefas dependentes do hipocampo em animais jovens e envelhecidos, as quais incluem o labirinto

aquático de Morris (van Praag, 2009), a esquiiva inibitória (Radák *et al.*, 2006) e o teste de reconhecimento de objetos (O'Callaghan *et al.*, 2007). Costa e colaboradores (2012) relataram que o exercício de corrida em esteira realizado uma vez por semana durante 8 semanas preveniu o declínio da memória de reconhecimento em ratos Wistar de meia-idade. Além disso, Cechetti e colaboradores (2012) mostraram que o exercício de corrida em esteira realizado 3 vezes por semana durante 12 semanas melhorou o aprendizado e a memória espacial e reduziu a lipoperoxidação após a hipoperfusão cerebral crônica em ratos.

O efeito da atividade física sobre o estado oxidativo celular é bastante complexo e depende de fatores como idade e sexo e também da intensidade e do tempo de duração do exercício (Pingitore *et al.*, 2015). Embora o exercício regular de intensidade moderada possa ser benéfico para reduzir o estresse oxidativo, o exercício aeróbico ou anaeróbico agudo e intenso está associado ao aumento da produção de espécies reativas em humanos (Radák *et al.*, 1999) e também em roedores (McArdle *et al.*, 2004). Sabe-se também que o exercício pode induzir o aumento do estresse oxidativo, mas esse estímulo parece ser necessário para promover a regulação das defesas antioxidantes endógenas pelo exercício (Pingitore *et al.*, 2015), conforme explicado pela teoria da Hormese (Figura 3). De acordo com esta teoria, o exercício físico regular está associado à redução de espécies reativas e ao aumento das defesas antioxidantes, reduzindo o dano oxidativo celular e promovendo ativação dos mecanismos de reparo em mamíferos (Vassalle *et al.*, 2015).

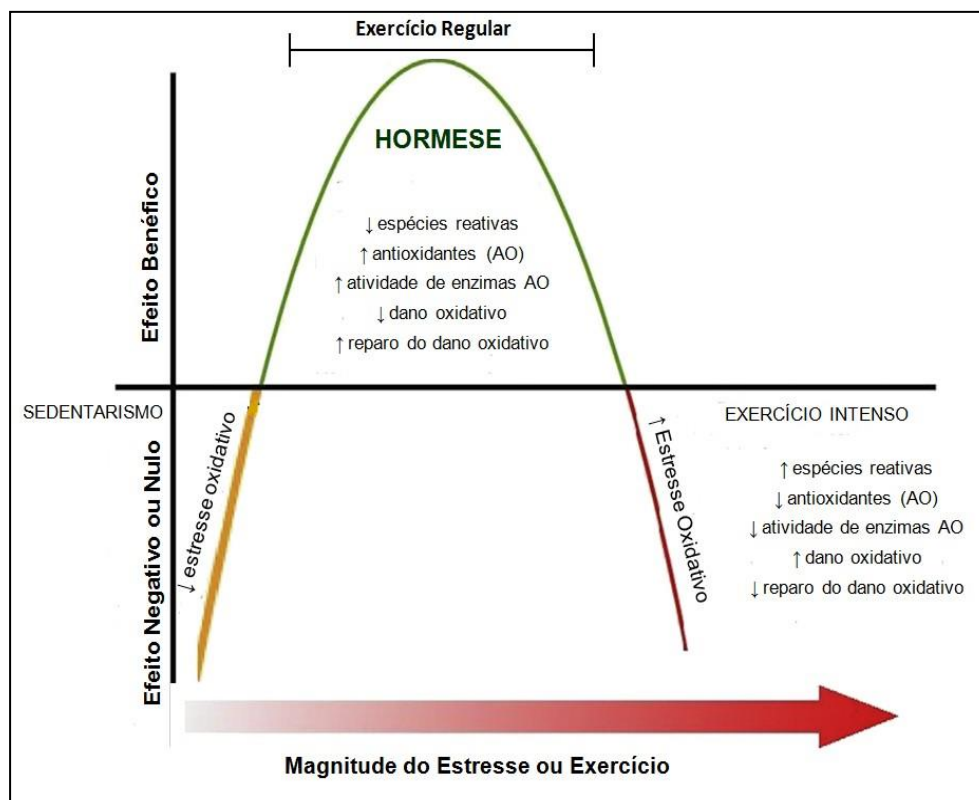


Figura 3. Hormese e exercício. O exercício regular promove a hormese, reduz o estresse oxidativo, protege contra o aparecimento e progressão de doenças, melhora o desempenho e a qualidade de vida. O exercício extenuante aumenta o estresse oxidativo e o risco de doenças. No entanto, um estado de estresse oxidativo que é muito baixo leva a uma falta de benefícios relacionados com hormese e pode ser prejudicial para a saúde. (**Adaptado de** Pingitore *et al.*, 2015).

Corroborando com a teoria da Hormese, Radák e colaboradores (2006) demonstraram uma redução na concentração de radicais livres no cérebro de ratos que foram submetidos ao exercício físico regular, enquanto outros estudos não observaram alterações na atividade de enzimas antioxidantes em estruturas cerebrais de ratos adultos submetidos ao exercício agudo e intenso (Acikgoz *et al.*, 2006; Aksu *et al.*, 2009).

A melhora da sinalização por **fatores tróficos** tem sido considerada uma das principais hipóteses para explicar os efeitos positivos da atividade física sobre a cognição em seres humanos, com a atenção centrada nas neurotrofinas (Salehi *et al.*, 2003; Salehi *et al.*, 2004). As neurotrofinas são compostas por uma família de polipeptídeos que regulam várias funções neuronais incluindo proliferação, sobrevivência, migração e diferenciação. O **fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e a neurotrofina-3 (NT-3)** fazem parte desta família e são sintetizados por neurônios-alvo, inicialmente nas formas de pré e pró-proteínas, sendo suas ações mediadas pela ligação a duas classes diferentes de receptores (Curtis *et al.*, 1995; Villanueva, 2013).

Evidências demonstram que a expressão de NT-3 está relacionada com a melhora da função cognitiva em roedores (Fischer *et al.*, 1994; Kaisho *et al.*, 1999). Neste sentido, foi observado que ratos envelhecidos que tiveram melhor desempenho na tarefa de memória de trabalho também apresentaram um aumento dos níveis de NT-3 no hipocampo (Bimonte *et al.*, 2003).

O BDNF está relacionado com o aumento da plasticidade sináptica (Lu e Chow, 1999; Nakata e Nakamura, 2007), com a indução e manutenção da fase tardia da potenciação de longa duração (Korte *et al.*, 1995), com a sobrevivência e a diferenciação neuronal (Reichardt, 2006) e com a proteção contra a morte de neurônios no hipocampo (Pringle *et al.*; 1996).

Alguns estudos têm demonstrado que tanto o exercício físico agudo quanto o regular podem aumentar os níveis periféricos de BDNF em indivíduos jovens e envelhecidos saudáveis (Coelho *et al.*, 2013; Szuhany *et al.*, 2015). Neste contexto, embora os mecanismos moleculares responsáveis pelo aumento dos níveis de BDNF em resposta ao exercício ainda não sejam totalmente compreendidos, estudos sugerem que esse aumento seja originado tanto de

fontes centrais quanto periféricas, sendo 70-80% do BDNF circulante derivado do cérebro e os níveis remanescentes derivados de fontes periféricas, como plaquetas, células B e T e monócitos (Rasmussen *et al.*, 2009).

Em modelos experimentais, tem sido demonstrado que o exercício físico, além de melhorar o desempenho comportamental, também facilita a plasticidade sináptica no hipocampo, uma estrutura-chave para a aprendizagem espacial (Cotman *et al.*, 2007). Várias evidências reforçam a ideia de que o BDNF é essencial para a função hipocampal, para a plasticidade e para o aprendizado (Kuipers e Bramham, 2006). Estudos em roedores demonstram que o exercício aumenta o BDNF em várias regiões do cérebro, especialmente no hipocampo, e que esse efeito do exercício pode ser observado até semanas após o seu término (Berchtold *et al.*, 2005). O aumento do BDNF hipocampal pelo exercício é mediado por sistemas de neurotransmissores (Russo-Neustadt e Chen, 2005), pelo sistema neuroendócrino (Cotman e Berchtold, 2002) e pelo **fator de crescimento semelhante a insulina-1 (IGF-1)** (Ding *et al.*, 2006). Assim como o BDNF, a expressão do gene do IGF-1 é aumentada nos neurônios hipocampais em resposta ao exercício, permanecendo elevada mesmo após vários dias do seu término (Ding *et al.*, 2006). Os níveis de IGF-1 periférico circulantes são rapidamente aumentados em resposta ao exercício e parecem ser essenciais para a neurogênese (Trejo *et al.*, 2001) e para a facilitação da memória induzida pelo exercício em ratos (Ding *et al.*, 2006) (Figura 4).

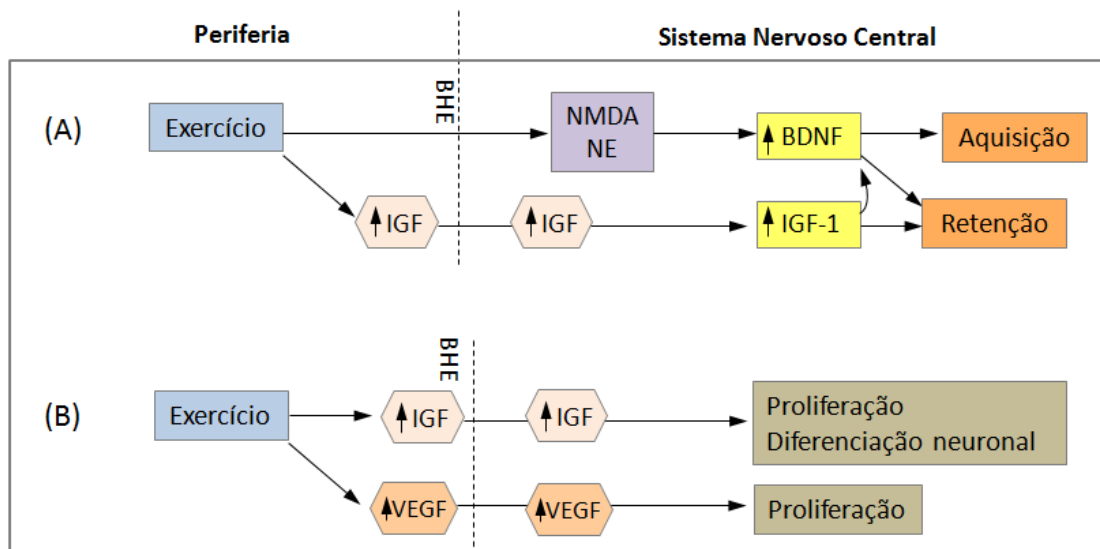


Figura 4. Efeito do exercício sobre o aprendizado e a memória através da cascata de fatores de crescimento. (A) O exercício aumenta o aprendizado pela indução do BDNF e do IGF-1. Neurotransmissores, incluindo os receptores NMDA e o sistema noradrenérgico (NE), o IGF-1 periférico e central medeiam a indução do BDNF hipocampal com o exercício. (B) O exercício estimula a neurogênese no hipocampo através da interação entre os efeitos de IGF-1 e VEGF. IGF-1 e VEGF periféricos atravessam a barreira hematoencefálica (BHE) e promovem o aumento da proliferação e sobrevivência celular (**Adaptado de** Cotman *et al.*, 2007).

O IGF-1 é um importante fator trófico para o crescimento e para reações metabólicas. Os principais órgãos responsáveis pela síntese de IGF-1 incluem os músculos, o fígado e o cérebro; neste último o IGF-1 é sintetizado principalmente pelos macrófagos perivasculares e pela microglia (Carro *et al.*, 2000).

No estudo realizado por Trejo e colaboradores (2001) foi observado que a liberação periférica de IGF-1 é um dos fatores responsável por induzir a proliferação celular no giro denteado, pois a administração crônica do anticorpo anti-IGF-1 preveniu os efeitos positivos do exercício de corrida em esteira em ratos adultos. Neste estudo, também foi demonstrado que o exercício físico promoveu a captação de IGF-1 circulante pelo cérebro, bem como a neurogênese no hipocampo. Além disso, foi relatado que um dos vários efeitos

do exercício mediado pelo IGF-1 no cérebro é promover o aumento da expressão de BDNF no hipocampo. Em outro estudo, realizado por Ding e colaboradores (2006), foi observado que o bloqueio do receptor de IGF-1 durante o exercício em ratos preveniu a melhora da memória induzida pelo exercício, e também reverteu o aumento dos níveis de BDNF. Além desses efeitos, tem sido demonstrado que o IGF-1 periférico também é necessário para a remodelação dos vasos induzida pelo exercício físico no cérebro de roedores (Lopez-Lopez *et al.*, 2004).

Outro fator trófico que tem sido estudado como alvo dos efeitos do exercício físico é o fator de **crescimento endotelial vascular (VEGF)**. O VEGF é uma importante proteína com função neuroprotetora, responsável por regular a proliferação das células endoteliais, a angiogênese, e está fortemente envolvido com a neurogênese (Fabel *et al.*, 2003; Ding *et al.*, 2006). Além disso, foi demonstrado que os efeitos da atividade física sobre o conteúdo de VEGF e sobre a expressão do seu RNA mensageiro parecem ser dose dependentes do exercício (Ding *et al.*, 2006).

Além da melhora da sinalização por fatores tróficos, os efeitos positivos do exercício físico sobre a cognição podem estar relacionados a outros mecanismos, como a regulação de enzimas-chave que também desempenham papel importante no processo de aprendizado e memória, como é o caso da Na⁺,K⁺-ATPase e da AChE (Wyse *et al.*, 2004; Haider *et al.*, 2014). Apesar destas evidências, estes mecanismos ainda têm sido pouco explorados. Assim, torna-se importante investigar os efeitos do exercício físico sobre a atividade destas enzimas, buscando avaliar as possíveis correlações com o desempenho dos animais jovens e envelhecidos nas tarefas de aprendizado e memória.

Diante do exposto, a **hipótese de trabalho** desta tese é de que o exercício físico moderado pode prevenir o declínio de memória relacionado à idade e que este efeito pode estar associado com a redução do estresse oxidativo, com o aumento da expressão de fatores neurotróficos e com a atividade das enzimas Na^+, K^+ -ATPase e AChE no hipocampo de ratos senescentes. Além disso, como o exercício atua no organismo como um todo, é possível que o músculo sóleo dos ratos senescentes responda de maneira diferente às alterações do estado oxidativo decorrentes do treinamento físico quando comparado ao músculo dos ratos jovens.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do exercício físico sobre a memória e sobre parâmetros bioquímicos e moleculares no hipocampo e no músculo esquelético de ratos senescentes.

2.1.1 Objetivos Específicos

- I. Investigar o efeito do exercício físico moderado sobre a função cognitiva de ratos Wistar machos de 3 e 22 meses de idade através da memória de referência na tarefa de Water maze, bem como investigar os parâmetros de estresse oxidativo e a expressão de fatores neurotróficos no hipocampo;
- II. Avaliar o efeito do exercício físico moderado sobre a função cognitiva de ratos Wistar machos de 3, 6 e 22 meses de idade, bem como avaliar a atividade das enzimas Na^+, K^+ -ATPase e AChE no hipocampo dos ratos após o treinamento cognitivo ou após o exercício físico combinado com o treinamento cognitivo;
- III. Estudar o efeito do exercício físico moderado sobre o estado oxidativo celular no músculo esquelético (sóleo) de ratos Wistar machos de 3 e 22 meses de idade.

3. CAPÍTULO I

Manuscrito: Treadmill running prevents age-related memory deficit and alters neurotrophic factors and oxidative damage in the hippocampus of Wistar rats – submetido

Treadmill running prevents age-related memory deficit and alters neurotrophic factors and oxidative damage in the hippocampus of Wistar rats

Cláudia Vanzella^{a*}, Juliana Dalibor Neves^b, Adriana Vizuete^a, Dirceu Aristimunha^a, Janaína Kolling^a, Aline Longoni^a, Carlos Alberto Saraiva Gonçalves^a, Angela Terezinha de Souza Wyse^a, Carlos Alexandre Netto^a

^aDepartment of Biochemistry, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^bPost-Graduation Program of Physiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

*Corresponding Author: Cláudia Vanzella, Departamento de Bioquímica, Instituto das Ciências da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel/fax: +55-051-33085568. E-mail address: cvanzella@gmail.com

4. CAPÍTULO II

Manuscrito: Forced treadmill exercise prevents spatial memory deficits in aged rats probably through the activation of Na^+, K^+ -ATPase in the hippocampus – publicado no periódico *Neurochemical Research*

Forced treadmill exercise prevents spatial memory deficits in aged rats through the activation of Na⁺,K⁺-ATPase in the hippocampus

Cláudia Vanzella^{1*}, Eduardo Farias Sanches¹, Felipe Kawa Odorcyk², Fabrício Nicola³, Janaína Kolling¹, Aline Longoni¹, Tiago Marcon dos Santos¹, Angela Terezinha de Souza Wyse¹, Carlos Alexandre Netto¹

¹Department of Biochemistry, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

²Post-Graduation Program of Physiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

³Post-Graduation Program of Neuroscience, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

Artigo publicado online em 16 de fevereiro de 2017 no periódico *Neurochemical Research* - doi: **10.1007/s11064-017-2196-x**, **8 páginas**.

5. CAPÍTULO III

Efeito do exercício físico sobre o estado oxidativo celular no músculo esquelético (sóleo) de ratos Wistar machos de 3 e 22 meses de idade.

1. INTRODUÇÃO

A sarcopenia é um fenômeno natural do processo de envelhecimento que resulta em perda de massa, de força e de função do músculo esquelético, normalmente acompanhada pela diminuição da mobilidade, da resistência física e de lentidão da marcha, fatores que aumentam o risco de quedas e de fraturas entre os idosos (Mitchell *et al.*, 2012).

O músculo esquelético humano é composto por dois tipos principais de fibras, do tipo I e II (Brooke e Kaiser, 1970). Existe uma variação na proporção destas fibras entre os músculos das diferentes regiões do corpo, o que está relacionado com a função desempenhada por cada um deles (Barstow *et al.*, 1996). As fibras do tipo I são fibras de contração lenta, apresentam um menor diâmetro e são ricas em mitocôndrias e enzimas oxidativas, enquanto que, as fibras do tipo II são de contração rápida, apresentam diâmetro maior e têm predomínio do metabolismo energético anaeróbico (Powers *et al.*, 1994).

Embora as causas da perda da função e da massa muscular relacionada à idade ainda não sejam totalmente compreendidas, o declínio funcional do músculo esquelético parece estar fortemente associado ao estresse oxidativo (Szczesny *et al.*, 2010). Além disso, estudo realizado por Porter (1995) demonstrou que com o avançar da idade o músculo esquelético de seres humanos diminui gradualmente de volume, principalmente devido a uma redução do número de unidades motoras e de fibras musculares, além da redução no tamanho das fibras do tipo II. Outro estudo demonstrou que, além da redução no tamanho das fibras do tipo II, o envelhecimento também promove uma troca de fibras do tipo II para fibras do tipo I (Balagopal *et al.*, 2001). Assim, os músculos que apresentam alta porcentagem de fibras de tipo I

são menos afetados e não apresentam grandes alterações pelo envelhecimento.

Entre as alterações do estado oxidativo celular que ocorrem no músculo com o envelhecimento, alguns estudos em roedores destacam um aumento do conteúdo de espécies reativas no músculo vasto lateral profundo (Bejma e Ji, 1999) e também um aumento da lipoperoxidação no músculo sóleo de ratos envelhecidos (Lambertucci *et al.*, 2007).

No organismo, os tecidos com maior taxa de consumo de oxigênio, como o cérebro, por exemplo, expressam maiores quantidades de enzimas antioxidantes do que aqueles com menor atividade metabólica (Jenkins, 1993). No músculo, um órgão bastante heterogêneo, a atividade das enzimas antioxidantes varia muito de acordo com o tipo de fibras; assim, as fibras do tipo I, por apresentarem caráter oxidativo, possuem maior atividade das enzimas antioxidantes em comparação às fibras do tipo II (Schiaffino e Reggiani, 2011).

Adams e colaboradores (1994) demonstraram que o músculo sóleo de ratos apresenta cerca de 97% de fibras do tipo I e apenas 3% de fibras do tipo II. Assim, por apresentar uma composição homogênea de fibras e ser um músculo que tem função postural, o sóleo é considerado um bom modelo para a investigação das alterações fisiológicas induzidas pelo treinamento físico em ratos jovens e envelhecidos (Lambertucci *et al.*, 2007).

Estudos em roedores demonstraram que a atividade contrátil do músculo pode promover o aumento acentuado de espécies reativas, devido ao aumento do consumo de O₂, especialmente nos casos de exercício intenso ou agudo (Davies *et al.*, 1982; Bejma and Ji, 1999). Durante o treinamento, a produção de espécies reativas tem sido atribuída ao alto consumo de O₂, que pode

chegar a 10-20 vezes os níveis sistêmicos (Astrand *et al.*, 1986) e até 100 a 200 vezes os níveis do músculo esquelético (Halliwell and Gutteridge, 2007), resultando em aumento substancial do fluxo de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial.

Contudo, o aumento de espécies reativas no músculo durante a atividade física parece ser necessário para promover a regulação das defesas antioxidantes endógenas, conforme postulado pela teoria da Hormese (Pingitore *et al.*, 2015). Neste contexto, alguns estudos têm demonstrado que, embora exista uma adaptação das defesas antioxidantes no organismo em resposta ao aumento da geração de substâncias oxidantes, essa adaptação é afetada no músculo de animais envelhecidos, de maneira que a produção de espécies reativas é superior à capacidade do sistema de defesa antioxidante, o que pode resultar em dano oxidativo ao músculo (Ji, 1993; Dilger e Johnson, 2008).

Assim, considerando que os efeitos do exercício físico ocorrem no organismo como um todo e que o músculo de ratos senescentes pode apresentar alterações decorrentes do envelhecimento, o objetivo desse capítulo foi avaliar o efeito do exercício físico moderado sobre o estado oxidativo celular no músculo sóleo dos ratos senescentes. A nossa hipótese de trabalho é de que o músculo sóleo dos ratos senescentes apresenta uma resposta diferente frente às alterações do estado oxidativo como consequência do treinamento físico quando comparado ao músculo dos ratos jovens.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Ratos Wistar machos de 3 (jovens) e 22 meses de idade (envelhecidos) foram obtidos do biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. Eles foram mantidos em uma sala com temperatura controlada (22 ± 1 °C), com ciclo claro/escuro (12/12 h), água e comida disponíveis *ad libitum*. Em todos os experimentos, foram seguidos o "Guia para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório" do NIH (publicação NIH No. 80-23, revisada em 1996) e as diretrizes governamentais oficiais, em conformidade com a Federação das Sociedades Brasileiras de Biologia Experimental. Os animais envelhecidos foram alojados em número de três por gaiola. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade sob o protocolo número 24199.

2.2 Protocolo de exercício físico

Os animais foram habituados na esteira ergométrica com o objetivo de minimizar estresse à novidade e foram divididos aleatoriamente em grupos sedentários (SED, não exercitados) e exercitados (EXE, 20 min de sessões diárias de corrida, 3 vezes por semana durante 4 semanas). O treinamento físico consistiu em sessões de corrida em uma esteira motorizada adaptada para roedores (INBRAMED TK 01, Porto Alegre, Brasil) a 60% da capacidade máxima de oxigênio dos animais (Cechetti *et al.*, 2012). O pico máximo de oxigênio (VO_2) foi mensurado indiretamente em todos os animais antes do treino. Cada rato correu a uma baixa velocidade inicial; a velocidade foi aumentada em 5 m/min a cada 3 min até ao ponto de exaustão (isto é, falha dos ratos de continuar a correr). O tempo de fadiga (em min) e a carga de

trabalho (em m/min) foram tomados como índices de capacidade de exercício, que foi por sua vez tomado como VO_2 máximo. Todos os procedimentos foram realizados entre 7 e 12 horas. O desenho experimental está demonstrado na Figura 1.

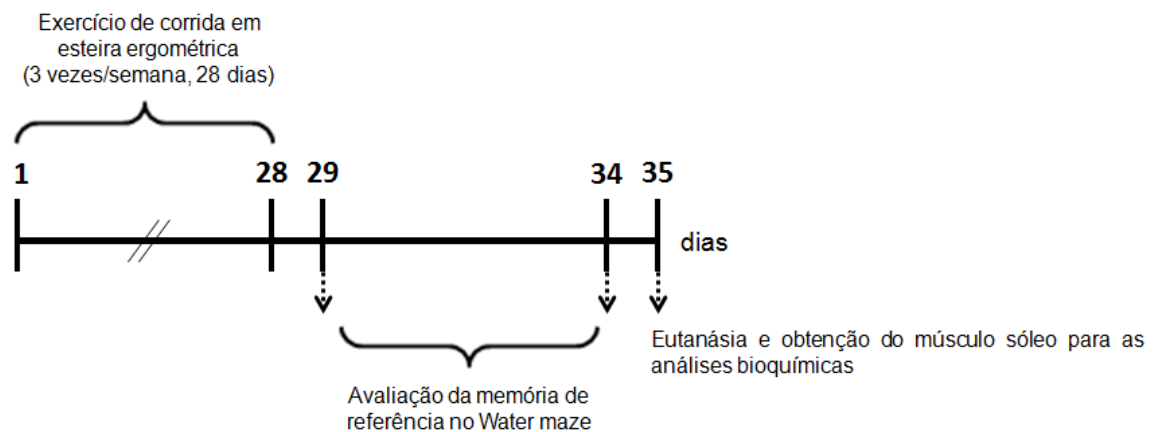


Figura 1. Desenho experimental. O protocolo de exercício de corrida em esteira ergométrica (20 min/dia, 3 vezes por semana durante 28 dias) foi utilizado. Avaliação da memória de referência iniciou-se 24 horas após a última sessão de exercício e foi realizado durante 5 dias, seguido pelo *probe trial*. Os ratos foram sacrificados 24 horas após a avaliação comportamental e o músculo sóleo foi dissecado para análise bioquímica.

2.3 Labirinto aquático de Morris

Após 24 horas da última sessão de exercício físico a memória espacial dos animais foi avaliada utilizando-se o labirinto aquático de Morris. O labirinto consiste em um tanque circular de 200 cm de diâmetro, sendo 40 cm de profundidade cobertos por água (temperatura de $\pm 23^\circ\text{C}$), situado em uma sala contendo pistas visuais nas paredes que o cercam. Uma plataforma com 10 cm de diâmetro encontra-se submersa 2 cm abaixo da superfície da água. Esta piscina é dividida, virtualmente, em 4 quadrantes e possui 4 pontos de largada para o teste, designados como N (norte), S (sul), L (leste) e O (oeste). Para a avaliação da memória, foram utilizados 2 protocolos distintos, descritos abaixo:

2.3.1 Protocolo de memória de referência

Neste protocolo a posição da plataforma permaneceu no mesmo local durante todo o período de treino.

Os ratos foram submetidos a uma sessão diária de treinamento durante 5 dias e o teste foi realizado no 6º dia. Cada sessão consistiu de quatro “*trials*” com 10 minutos de intervalo entre eles. Nos *trials*, as posições de partida foram escolhidas aleatoriamente e cada animal foi colocado no tanque sempre de frente para a parede. A ordem da posição de partida variou em cada *trial* e nenhuma sequência foi repetida nos dias de fase de aquisição. Os ratos tinham 60 segundos para localizar a plataforma em cada *trial*; se a plataforma não fosse encontrada, o animal era gentilmente guiado e deixado sobre ela por cerca de 10 segundos. Após cada *trial* os animais eram secos e colocados em suas gaiolas. A latência para encontrar a plataforma foi medida em cada *trial* e a latência média para cada dia de treinamento foi calculada. Vinte e quatro horas após o último treino, um teste de 60 segundos (*probe trial*), sem a plataforma foi realizado para avaliar a memória de longo prazo para a posição da plataforma. Todos os animais foram colocados no labirinto em um mesmo ponto, o mais longe possível da posição da plataforma e foi avaliado o tempo que cada animal levou para encontrar a posição inicial da plataforma (Arteni *et al.*, 2003). Os resultados deste teste cognitivo foram relatados no Capítulo I e por isso não serão repetidos neste Capítulo.

2.4 Preparação das amostras

Vinte e quatro horas após a última sessão de avaliação comportamental, os animais foram eutanasiados por decapitação, sem anestesia e o músculo sóleo bilateral foi removido cirurgicamente. Para avaliar o conteúdo das

espécies reativas, das sulfidrilas, das proteínas carboniladas e as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), o sóleo foi homogeneizado em 10 volumes (1:10, p/v) de tampão de fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4 contendo KCl 140 mM. Os homogeneizados foram então centrifugados a 800 x g durante 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado para os ensaios. Para determinar os níveis de TBARS, o sóleo foi homogeneizado num tubo de Pyrex 1:10 (p/v) em KCl a 1,15%. Os homogeneizados foram centrifugados a 800 x g durante 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio.

2.5 Determinação de espécies reativas

A produção de espécies reativas foi avaliada de conforme descrito por LeBel e colaboradores (1992) e baseou-se na oxidação de 2'7'-dicloro-diidro-fluoresceína (H_2DCF). As amostras (60 μ L) foram incubadas no escuro durante 30 minutos (37 °C) com 240 μ L de solução de diacetato de 2'7'-dicloro-diidro-fluoresceína (H_2DCF -DA) na concentração de 100 μ M. O H_2DCF -DA é clivado pelas esterases celulares resultando em H_2DCF , que é oxidado por espécies reativas presentes na amostra. A última reação produz o composto fluorescente DCF que foi medido a 488 nm de excitação e 525 nm de emissão. Os resultados foram expressos por nmol de DCF formado por mg de proteína. Uma curva de calibração foi realizada utilizando DCF purificado como padrão.

2.6 Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Os níveis de TBARS, uma medida de peroxidação lipídica, foram determinados de acordo com Ohkawa e colaboradores (1979). O sobrenadante em KCl a 1,15% foi misturado com ácido tricloroacético a 20% e ácido

tiobarbitúrico a 0,8% e foi aquecido em banho de água fervente durante 60 minutos. Os níveis de TBARS foram determinados pela absorbância a 535 nm. Os resultados foram expressos como nmol de malonaldeído (MDA) por mg de proteína.

2.7 Determinação do conteúdo de sulfidrilas totais

Este ensaio foi realizado conforme descrito por Aksenov e Markesbery (2001), baseando-se na redução do ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) por tióis, que por sua vez se oxidam, gerando um derivado amarelo (TNB) cuja absorção é medida espectrofotometricamente a 412 nm. Foi adicionado 50 µL de sobrenadante a 1 mL de tampão fosfato de sódio pH 7,4 contendo EDTA 1 mM. A reação foi iniciada pela adição de 30 µL de DTNB 10 mM que foi após incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente (no escuro). Os resultados foram expressos como nmol TNB por mg de proteína.

2.8 Determinação do conteúdo de proteínas carboniladas

As proteínas modificadas oxidativamente apresentam um aumento do conteúdo de carbonilas (Stadtman e Levine, 2003). O conteúdo destas proteínas foi avaliado por meio da reação com a dinitrofenilhidrazina, o que leva a formação de dinitrofenilhidrazona, um composto amarelo que é mensurado espectrofotometricamente a 370 nm.

Foram adicionados 100 µL do sobrenadante em tubos de plástico contendo 400 µL de dinitrofenilhidrazina 10 mM (preparada em HCl 2 M), que foram mantidos no escuro durante 1 hora e agitados em vortex a cada 15 minutos. Depois, adicionou-se a cada tubo 500 µL de ácido tricloroacético a 20%. A mistura foi agitada em vortex e centrifugada a 20000 g durante 3

minutos. O sobrenadante obtido foi descartado. Lavou-se o sedimento com 1 mL de etanol/acetato de etila (1:1 v/v), agitou-se em vórtex e centrifugou-se a 20000 g durante 3 minutos. O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento ressuspenso em 600 µL de guanidina 6 M (preparada numa solução de fosfato de potássio 20 mM pH 2,3). A amostra foi submetida a agitação e incubada a 60 °C durante 15 minutos. Após, centrifugou-se a 20000 g durante 3 minutos e mediu-se a absorbância a 370 nm (UV) em espectrofotômetro com controle de temperatura (Hitachi High Technologies America, Pleasanton, CA). Os resultados foram expressos como conteúdo de proteína carbonilada (nmol/mg de proteína).

2.9 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

O ensaio de atividade da SOD baseia-se na capacidade de auto-oxidação do pirogalol, um processo altamente dependente de superóxido, que é o substrato desta enzima. A inibição da auto-oxidação deste composto ocorre na presença da SOD, cuja atividade pode então ser indiretamente avaliada a 420 nm (Marklund, 1985). Uma curva de calibração foi realizada utilizando-se uma SOD purificada como padrão, para calcular a atividade de SOD presente nas amostras. Os resultados foram expressos como unidades por miligrama de proteína. A atividade da SOD foi expressa como a quantidade de enzima que inibe a oxidação da epinefrina em 50%, que é igual a 1 unidade.

2.10 Determinação da atividade da catalase (CAT)

A atividade da CAT foi avaliada utilizando-se um espectrofotômetro de duplo feixe com controle de temperatura (Hitachi U-2001). Este método baseia-se na decomposição do H₂O₂ a 240 nm num meio de reação contendo H₂O₂ 20

mM, Triton X-100 a 0,1%, tampão fosfato de potássio 10 mM pH 7,0 e 0,1-0,3 mg proteína/mL (Aebi, 1984). Uma unidade CAT é definida como 1 mmol de H_2O_2 consumida por minuto e a atividade específica é representada como unidades CAT por mg de proteína.

2.11 Determinação da atividade da glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi medida utilizando tertbutil-hidroperóxido como substrato. O consumo de NADPH foi monitorizado a 340 nm utilizando o leitor de microplacas SpectraMax M5 (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies). O meio continha 2 mM de GSH, 0,15 U/mL de GSH redutase, 0,4 mM de azida, 0,5 mM de tertbutil-hidroperóxido e 0,1 mM de NADPH. Uma unidade GPx foi definida como 1 mmol de NADPH consumido por minuto e a actividade específica é representada como unidades de GPx / mg de proteína (Wendel, 1981).

2.12 Proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi quantificada de acordo com o método descrito por Bradford (1976), usando albumina bovina como padrão.

2.13 Análise estatística

Os resultados foram avaliados utilizando-se análise de variância (ANOVA) de duas ou uma via, quando adequado, seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão (SE). O $p < 0,05$ foi considerado significativo.

3.1 Conteúdo de espécies reativas

Os ratos de 3 e 22 meses submetidos ao exercício de corrida em esteira apresentaram um aumento dos níveis de espécies reativas no músculo sóleo quando comparados ao grupo jovem controle (Figura 2; $F_{(1,19)} = 12.46$; $p < 0.05$).

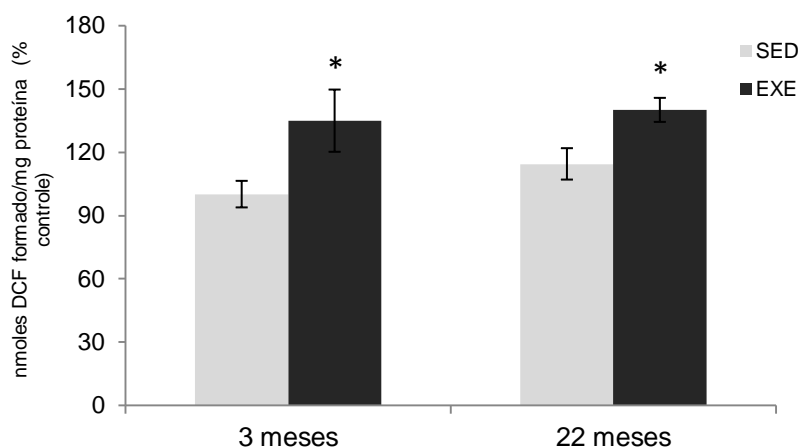


Figura 2. Efeito do exercício de corrida em esteira sobre o conteúdo de espécies reativas no músculo sóleo de ratos de 3 e 22 meses de idade ($n = 5$ por grupo). Os resultados, calculados em nmoles de DCF formado por mg de proteína, estão expressos como porcentagem do grupo controle (3 meses SED). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. *Valores significativamente diferentes do grupo controle; $p < 0,05$.

3.2 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Os ratos de 3 meses submetidos ao exercício físico apresentaram um aumento da lipoperoxidação no músculo sóleo quando comparados ao grupo controle (3 meses SED) (Figura 3; $F_{(1,21)} = 13,34$; $p < 0,05$). Um achado interessante, foi que o envelhecimento levou a um aumento da lipoperoxidação basal no músculo sóleo ($F_{(1,21)} = 34,73$; $p < 0,05$), enquanto que o exercício não teve efeito nos animais de 22 meses.

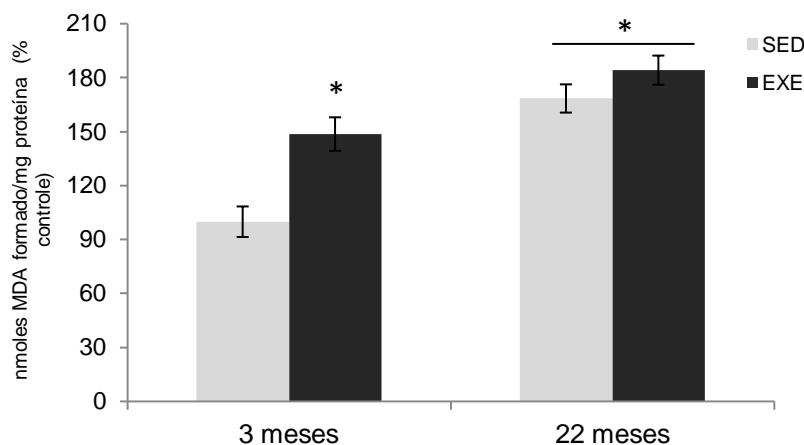


Figura 3. Efeito do exercício de corrida em esteira sobre a lipoperoxidação no músculo sóleo de ratos de 3 e 22 meses de idade (n= 5-7 por grupo). Os resultados, calculados em nmoles de MDA formado por mg de proteína, estão expressos como porcentagem do grupo controle (3 meses SED). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. *Valores significativamente diferentes do grupo controle; $p < 0,05$.

3.3 Conteúdo de sulfidrilas totais

Conforme demonstrado na figura 4, o exercício físico reduziu o conteúdo de sulfidrilas no músculo sóleo dos ratos de 22 meses quando comparado ao grupo controle ($F_{(1,20)} = 5,67$; $p < 0,05$), mas não alterou o conteúdo de sulfidrilas nos animais de 3 meses.

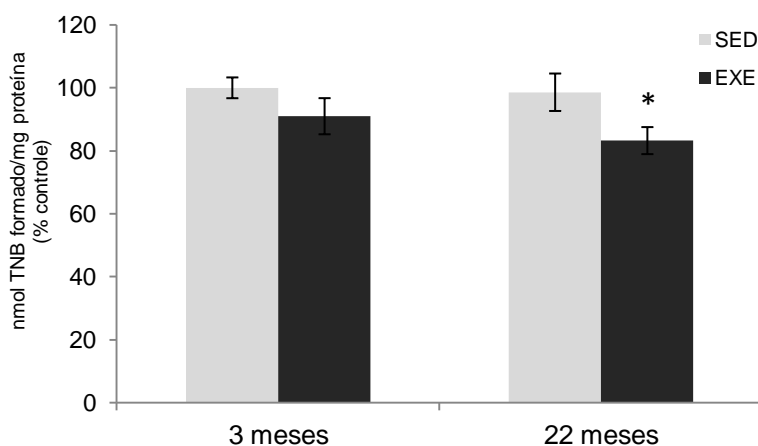


Figura 4. Efeito do exercício de corrida em esteira sobre o conteúdo de sulfidrilas no músculo sóleo de ratos de 3 e 22 meses de idade (n= 5-6 por grupo). Os resultados, calculados em nmoles de TNB formado por mg de proteína, estão expressos como porcentagem do grupo

controle (3 meses SED). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. *Valores significativamente diferentes do grupo controle; $p < 0,05$.

3.4 Conteúdo de proteínas carboniladas

Corroborando com os resultados do conteúdo de sulfidrilas, os ratos de 22 meses submetidos ao exercício físico apresentaram um aumento no conteúdo de proteínas carboniladas no músculo sóleo quando comparado ao grupo controle (Figura 5; $F_{(1,20)} = 10,38$; $p < 0,05$); contudo, não foram observadas diferenças nos ratos de 3 meses.

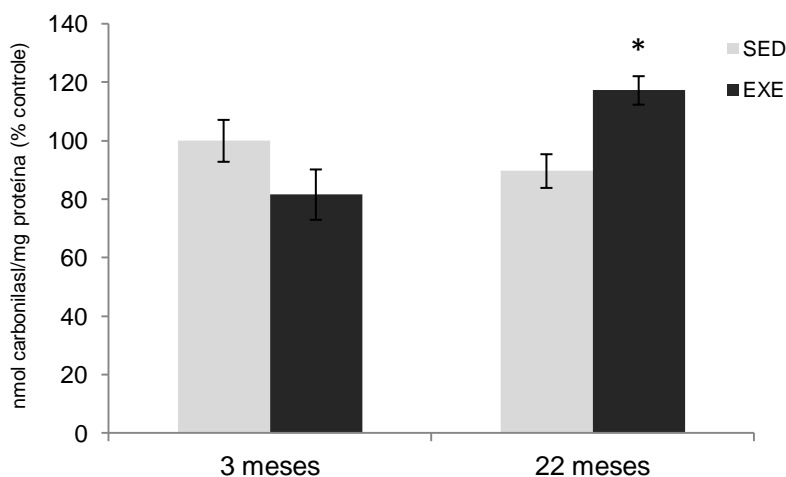


Figura 5. Efeito do exercício de corrida em esteira sobre o conteúdo de proteínas carboniladas no músculo sóleo de ratos de 3 e 22 meses de idade ($n = 5-6$ por grupo). Os resultados, calculados em nmoles de carbonilas formado por mg de proteína, estão expressos como porcentagem do grupo controle (3 meses SED). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. *Valores significativamente diferentes do grupo controle; $p < 0,05$.

3.5 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

Os ratos de 22 meses apresentaram uma redução na atividade da enzima SOD no músculo sóleo quando comparado ao grupo controle (Figura 6; $F_{(1,25)} = 11,58$; $p < 0,05$); contudo, o exercício reverteu parcialmente esse efeito

do envelhecimento ($F_{(1,25)} = 4,47$; $p < 0,05$). O exercício não alterou a atividade da SOD no músculo sóleo dos ratos de 3 meses.

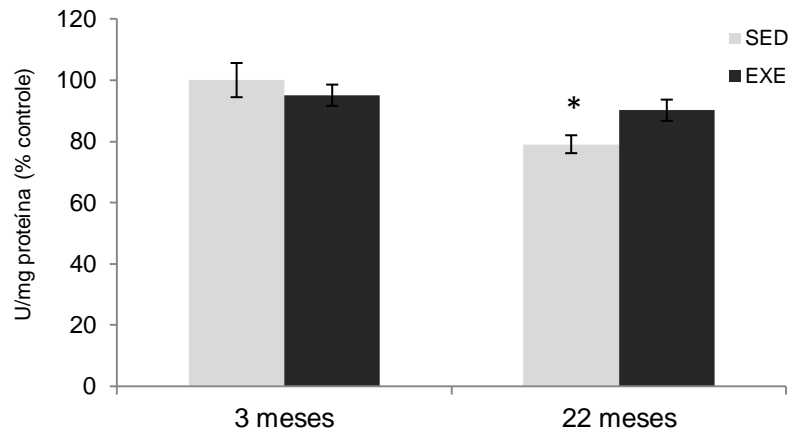


Figura 6. Efeito do exercício de corrida em esteira sobre a atividade da SOD no músculo sóleo de ratos de 3 e 22 meses de idade ($n = 5-7$ por grupo). Os resultados, calculados em unidades (U) por mg de proteína, estão expressos como porcentagem do grupo controle (3 meses SED). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. *Valores significativamente diferentes do grupo controle; $p < 0,05$.

3.6 Atividade da catalase (CAT)

Os ratos de 3 meses submetidos ao exercício físico mostraram uma redução na atividade da enzima CAT no músculo sóleo em relação ao grupo controle (3 meses SED) (Figura 7; $F_{(1,20)} = 18,15$; $p < 0,05$). O grupo 22 meses SED não apresentou diferenças em relação aos grupos 3 meses SED e EXE, mas foi diferente do grupo envelhecido exercitado ($F_{(1,20)} = 4,16$; $p < 0,05$).

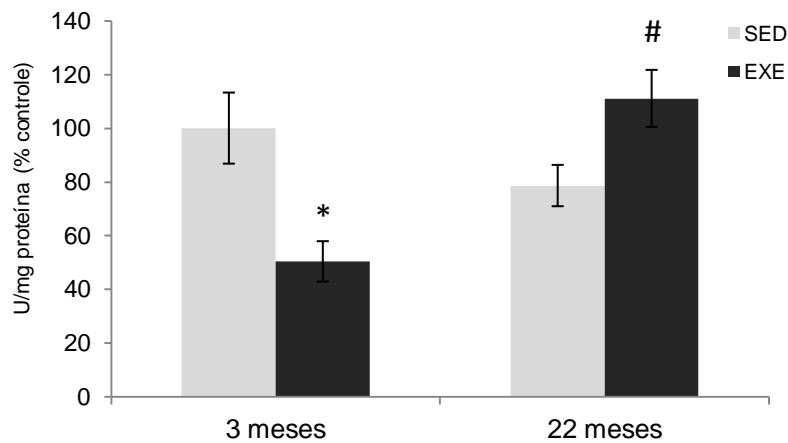


Figura 7. Efeito do exercício de corrida em esteira sobre a atividade da CAT no músculo sóleo de ratos de 3 e 22 meses de idade (n= 4-6 por grupo). Os resultados, calculados em unidades (U) por mg de proteína, estão expressos como porcentagem do grupo controle (3 meses SED). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. *Valores significativamente diferentes do grupo controle; $p < 0,05$. #Valores significativamente diferentes do grupo 22 meses SED e iguais aos do grupo controle; $p < 0,05$.

3.7 Atividade da glutathiona peroxidase (GPx)

Não foram observadas diferenças em relação a atividade da enzima GPx no músculo sóleo de ratos de 3 e 22 meses de idade submetidos ou não ao exercício de corrida em esteira (Figura 8).

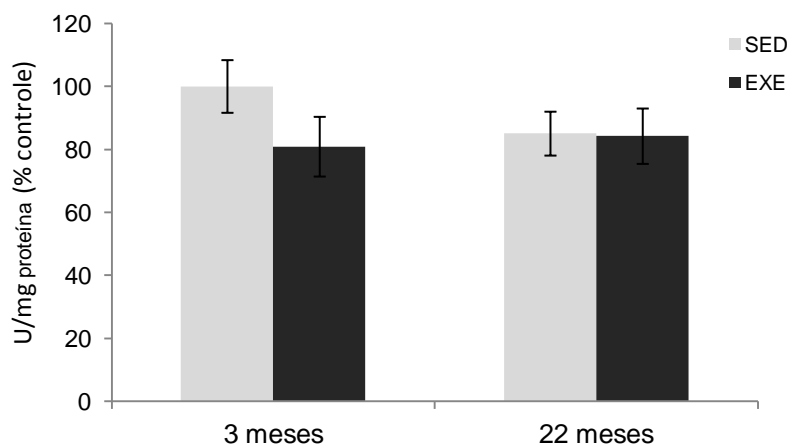


Figura 8. Efeito do exercício de corrida em esteira sobre a atividade da GPx no músculo sóleo de ratos de 3 e 22 meses de idade (n= 4-6 por grupo). Os resultados, calculados em unidades

(U) por mg de proteína, estão expressos como porcentagem do grupo controle (3 meses SED). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão.

4. DISCUSSÃO

Sabendo-se que as alterações induzidas pelo envelhecimento ocorrem nos diferentes tecidos do organismo e que o exercício tem efeito direto sobre o músculo esquelético, o objetivo desse Capítulo foi avaliar o efeito do exercício físico moderado sobre o estado oxidativo celular no músculo sóleo de ratos senescentes que apresentaram uma melhora do desempenho cognitivo na tarefa de memória espacial.

De acordo com a hipótese de trabalho desta tese, o exercício físico induziu o aumento do estresse oxidativo no músculo esquelético sóleo de ratos jovens e envelhecidos; no entanto, este aumento foi maior no sóleo dos animais envelhecidos, que apresentou acentuado dano às proteínas. É possível que as diferenças observadas entre os ratos jovens e envelhecidos estejam relacionadas com o fato de que a capacidade de adaptação do sistema de defesa antioxidante no músculo frente as alterações do estado oxidativo como consequência do exercício seja diferente nos ratos senescentes, conforme previamente demonstrado por outros autores (Ji, 2008; Barbieri e Sestili, 2011).

No presente estudo, os animais envelhecidos não apresentaram alterações no conteúdo de espécies reativas no músculo sóleo em relação aos ratos jovens. Contudo, exercício físico moderado induziu o aumento do conteúdo destas espécies no sóleo dos ratos de ambas as idades. Neste contexto, Bejma e Ji (1999) relataram que o exercício agudo aumentou significativamente o conteúdo de espécies reativas no músculo vasto lateral profundo de ratas de 25 meses de idade, quando comparado aos animais

adultos. Conforme demonstrado na figura 3, foi observado um aumento da lipoperoxidação associado à idade no músculo sóleo dos ratos de 22 meses. Corroborando com este resultado, alguns estudos demonstraram o aumento da lipoperoxidação no músculo sóleo de ratos envelhecidos (Gündüz *et al.*, 2004; Lambertucci *et al.*, 2007). O exercício físico moderado aumentou a lipoperoxidação no músculo sóleo dos ratos jovens, resultado que está de acordo com o aumento do conteúdo de espécies reativas, mas não alterou este parâmetro nos animais envelhecidos. De acordo com esses dados, foi demonstrado que o exercício de baixa intensidade durante 13 semanas levou ao aumento da lipoperoxidação no sóleo de ratos de 2 meses de idade, enquanto que promoveu uma redução da lipoperoxidação associada à idade em ratos de 21 meses (Lambertucci *et al.*, 2007). Por outro lado, Bejma e Ji (1999) relataram que o exercício agudo aumentou a lipoperoxidação no músculo vasto lateral profundo de ratas adultas e envelhecidas.

Em relação à avaliação do dano às proteínas, os resultados mostram que os ratos de 22 meses exercitados apresentaram uma redução no conteúdo de sulfidrilas totais e um aumento no conteúdo de proteínas carboniladas, demonstrando que o exercício está relacionado com o aumento do dano às proteínas nos animais envelhecidos. Neste sentido, foi demonstrado que o exercício agudo de corrida em esteira (Reznick *et al.*, 1992) e que o treino de resistência durante 12 semanas (Witt *et al.*, 1992) induziram aumento significativo na oxidação de proteínas no músculo esquelético de ratos. Contudo, o exercício não alterou o conteúdo de sulfidrilas totais e de proteínas carboniladas no sóleo dos ratos jovens, resultado semelhante ao previamente descrito por Bejma e Ji (1999).

Entre os mecanismos de defesa do organismo, as enzimas antioxidantes são consideradas a defesa primária para prevenir as macromoléculas biológicas do dano oxidativo (Siqueira *et al.*, 2005), sendo a SOD a enzima responsável por converter o $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 . A figura 6 mostra que os ratos de 22 meses apresentaram uma redução na atividade da SOD no músculo sóleo. Em contrapartida, alguns estudos demonstram que não há alteração no conteúdo ou na atividade desta enzima no sóleo de roedores envelhecidos (Hollander *et al.*, 2000; Gündüz *et al.*, 2004; Vasilaki *et al.*, 2006), enquanto outros mostram que há o aumento na atividade da SOD no músculo sóleo com o envelhecimento (Oh-Ishi *et al.*, 1995; Lambertucci *et al.*, 2007). Esses resultados conflitantes em relação à atividade da SOD no músculo de animais envelhecidos podem ser decorrentes das diferenças entre as linhagens de roedores, das condições de manutenção e dos procedimentos experimentais, ou mesmo podem refletir a formação do seu substrato, o $O_2^{\cdot-}$, uma vez que a atividade desta enzima também pode ser induzida pelo estresse peroxidativo (Benzi e Moretti, 1995).

Os resultados demonstram que o exercício físico moderado promoveu um aumento na atividade da SOD no sóleo dos ratos envelhecidos. Pinho e colaboradores (2006) relataram um aumento da atividade da SOD nos músculos quadríceps e gastrocnêmio de ratos de 8-12 meses após o exercício de corrida em esteira durante 12 semanas. Além disso, Tromm e colaboradores (2016) relataram um aumento da atividade da SOD em ratos de 24 meses de idade submetidos ao exercício de corrida quando comparado aos animais sedentários de mesma idade.

Ainda em relação às enzimas antioxidantes, o H_2O_2 formado na reação catalisada pela SOD poderá ser convertido em água pela ação das enzimas

antioxidantes CAT ou GPx. No presente estudo, não foram observadas alterações relacionadas à idade na atividade da CAT no músculo sóleo de ratos. De acordo com esse resultado, Hollander e colaboradores (2000) também não encontraram alterações no conteúdo desta proteína no sóleo de ratos de 25 meses em comparação aos animais jovens. No entanto, alguns estudos demonstram que há um aumento na atividade da CAT no músculo sóleo com a idade (Gündüz *et al.*, 2004; Lambertucci *et al.*, 2007). Conforme demonstrado na figura 7, o exercício físico moderado reduziu a atividade da CAT nos ratos jovens, enquanto promoveu um aumento da sua atividade nos ratos envelhecidos em relação aos animais sedentários de mesma idade. De maneira semelhante, Pinho e colaboradores (2006) relataram uma redução na atividade da CAT nos músculos quadríceps e gastrocnêmio de ratos adultos submetidos ao exercício.

A figura 8 mostra o efeito do envelhecimento e do exercício físico sobre a atividade da GPx no músculo sóleo de ratos. Contudo, não foram observados efeitos das variáveis estudadas sobre a atividade desta enzima. De acordo com esses resultados, Gündüz e colaboradores (2004) também não observaram alterações na atividade da GPx no sóleo de ratos de envelhecidos. Além disso, Lambertucci e colaboradores (2007) não encontraram efeito do protocolo de exercício físico utilizado sobre a atividade da GPx no músculo de ratos envelhecidos (Gündüz *et al.*, 2004; Lambertucci *et al.*, 2007).

Diante do exposto, os resultados obtidos para os animais jovens demonstram que, embora eles sejam susceptíveis ao aumento do estresse oxidativo no músculo em resposta ao exercício físico, evidenciado pelo aumento do conteúdo de espécies reativas e da lipoperoxidação; é importante ressaltar que este protocolo de exercício não alterou os parâmetros de dano

oxidativo às proteínas nestes animais. Assim, considerando que o exercício não aumentou a atividade das enzimas antioxidantes no músculo dos ratos jovens, é possível sugerir que existam mecanismos de compensação de outros sistemas, como o sistema de defesa antioxidante não enzimático, a fim de evitar o dano oxidativo às proteínas como resultado do exercício físico.

Em conjunto, os resultados do **Capítulo III** demonstram: I) o aumento da lipoperoxidação e a redução na atividade da enzima SOD relacionado à idade no músculo sóleo; II) o aumento do conteúdo de espécies reativas e da lipoperoxidação, e a redução na atividade da enzima CAT induzido pelo exercício no sóleo de ratos de 3 meses; III) o aumento do conteúdo de espécies reativas e do dano às proteínas, bem como o aumento na atividade das enzimas SOD e CAT induzidos pelo exercício no sóleo de ratos de 22 meses. Estes resultados sugerem que o envelhecimento está relacionado com algumas alterações do estado oxidativo celular no músculo sóleo. Além disso, demonstram que o sóleo dos ratos de 22 meses é mais sensível do que dos ratos de 3 meses às alterações do estado oxidativo celular induzidas pelo exercício físico, possivelmente devido à capacidade de adaptação reduzida do sistema de defesa antioxidante relacionado ao envelhecimento.

6. DISCUSSÃO

A presente tese teve por objetivo investigar os efeitos do exercício físico moderado sobre a memória e sobre parâmetros bioquímicos e moleculares no hipocampo e no músculo esquelético sóleo de ratos senescentes. Mais especificamente, as diferenças em relação ao desempenho nas tarefas de memória espacial entre ratos jovens e envelhecidos foram analisadas e comparadas, assim como os possíveis mecanismos moleculares para explicar os efeitos benéficos do exercício sobre a função cerebral nos animais envelhecidos.

O envelhecimento é um processo biológico dependente do tempo e que produz alterações físicas e anatômicas que reduzem a atividade fisiológica e bioquímica de muitos órgãos (Farooqui and Farooqui, 2009; Hung *et al.*, 2010). Neste sentido, o envelhecimento pode estar associado com alterações funcionais e estruturais no hipocampo (Rosenzweig e Barnes, 2003), uma estrutura que é fundamental para funções cognitivas como aprendizado e memória. Assim, alguns estudos em roedores têm demonstrado que durante o envelhecimento há uma redução do desempenho cognitivo, a qual parece estar associada com o comprometimento da transmissão sináptica, alteração dos níveis de neurotransmissores (Haider *et al.*, 2014) e também com a redução da neurogênese hipocampal (Fabel *et al.*, 2003). O aumento das espécies reativas no cérebro durante o envelhecimento é um ponto importante a ser considerado, uma vez que, devido a sua alta taxa metabólica e sua capacidade de regeneração celular diminuída em relação a outros órgãos, o cérebro é mais susceptível aos efeitos danosos do estresse oxidativo; além disso, o aumento dos níveis de espécies reativas relacionado à idade tem sido frequentemente associado ao declínio da função cognitiva (Fukui *et al.*, 2002; Mulero *et al.*, 2011).

O **Capítulo I** investigou o efeito do exercício físico moderado sobre a função cognitiva de ratos Wistar machos de 3 e 22 meses de idade na tarefa de memória de referência no Water maze, bem como o efeito do exercício sobre parâmetros de estresse oxidativo tais como o conteúdo de espécies reativas, lipoperoxidação, atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT e também na expressão de fatores neurotróficos como BDNF, NT-3, IGF-1 e VEGF no hipocampo. Confirmando dados de estudos prévios (Socci *et al.*, 1995; Taridi *et al.*, 2014), os resultados demonstraram que os animais envelhecidos apresentaram déficit de aquisição da memória de referência. Contudo, o exercício físico preveniu esse declínio cognitivo relacionado à idade, melhorando o desempenho dos ratos envelhecidos na tarefa de memória espacial. De acordo com esses achados, Sampedro-Piquero e colaboradores (2013) demonstraram que o exercício voluntário em uma roda de corrida durante 2 meses melhorou a memória espacial em ratos envelhecidos e outro estudo relatou que o exercício de corrida durante 12 semanas melhorou a memória aversiva e de reconhecimento em animais senescentes (Flôres *et al.*, 2014).

Considerando a necessidade de um melhor entendimento sobre os mecanismos pelos quais o exercício físico exerce seus efeitos positivos sobre a função cognitiva durante o envelhecimento, neste primeiro Capítulo investigamos inicialmente a sua relação com o estresse oxidativo e com a expressão de alguns fatores neurotróficos no hipocampo.

Evidências de estudos em animais demonstram o envolvimento das espécies reativas durante o processo de envelhecimento e sua relação com o declínio da função cognitiva (Fukui *et al.*, 2001, 2002; Mulero *et al.*, 2011). Foi observado um aumento do estresse oxidativo no hipocampo dos ratos

envelhecidos, avaliado pelo aumento do conteúdo de espécies reativas e de lipoperoxidação, enquanto que os animais de mesma idade que foram submetidos ao exercício físico apresentaram uma redução significativa destes parâmetros. Os resultados também demonstram uma correlação positiva importante entre o conteúdo espécies reativas e da lipoperoxidação no hipocampo com a latência (tempo) dos ratos envelhecidos exercitados para encontrar a plataforma no quinto dia de treino na tarefa de memória de referência no Water maze; ou seja, a redução dos parâmetros de estresse oxidativo no hipocampo pode estar associada com melhora da memória relacionada ao exercício. Esta correlação é realizada utilizando-se o desempenho dos animais no último dia de treino da fase de aquisição da memória de referência (quinto dia), porque é normalmente quando se observa a diferença máxima da latência em relação ao primeiro dia. No entanto, não houve alteração na razão entre as enzimas antioxidantes SOD e CAT, o que demonstra que o exercício pode estar atuando sobre o dano oxidativo através de diferentes vias moleculares.

Com vistas ao entendimento dos efeitos benéficos do exercício físico sobre a memória, grande atenção tem sido dada a sinalização mediada por fatores neurotróficos. Esses fatores são proteínas importantes que estão envolvidas com diversas funções que incluem a manutenção da sobrevivência e diferenciação celular, transmissão sináptica, aumento da resistência ao estresse oxidativo e memória (Guo e Mattson, 2000; Leeds *et al.*, 2005; Klumpp *et al.*, 2006). Os resultados mostram que o exercício físico aumentou a expressão dos fatores neurotróficos BDNF, NT-3 e IGF-1 no hipocampo de ratos envelhecidos, mas não alterou a expressão do VEGF. De acordo com esses resultados, estudos demonstram que o exercício pode modular a

expressão de fatores neurotróficos mesmo quando iniciado em uma idade mais avançada (Van Praag *et al.*, 2005). O BDNF e o IGF-1 têm sido muito estudados nos últimos anos e vários estudos demonstraram que ambos desempenham funções cruciais na melhora da memória em resposta ao exercício (Trejo *et al.*, 2001; Ding *et al.*, 2006). Além disso, foi demonstrado que existe uma correlação positiva entre os níveis de atividade física e a expressão do RNA mensageiro do BDNF no hipocampo de ratos (Neeper *et al.*, 1996). Ding e colaboradores (2006) relataram que o aumento do BDNF hipocampal pelo exercício também é mediado pelo IGF-1. A expressão do gene do IGF-1 é aumentada nos neurônios hipocâmpais em resposta ao exercício, assim como os níveis de IGF-1 circulantes, que parecem ser essenciais para a neurogênese (Trejo *et al.*, 2001) e para a facilitação da memória induzida pelo exercício em ratos (Ding *et al.*, 2006).

O aumento da expressão de NT-3 pelo exercício observado neste trabalho é de grande relevância, pois há evidências que demonstram a sua importância para a função cognitiva durante o envelhecimento, especialmente no hipocampo (Kaisho *et al.*, 1999; Bimonte *et al.*, 2003). Foi relatado que a infusão intracerebroventricular de NT-3 melhorou o aprendizado espacial em ratos envelhecidos (Fischer *et al.*, 1994) e que a superexpressão desta neurotrofina em camundongos transgênicos preveniu o declínio de memória espacial associado à idade (Kaisho *et al.*, 1999). Este resultado é a primeira evidência de que o exercício físico aumenta a expressão de NT-3 no hipocampo de ratos envelhecidos e sugere que, a regulação dos fatores neurotróficos juntamente com a redução do estresse oxidativo, pode ser um mecanismo importante por meio do qual o exercício físico pode estar

promovendo seus efeitos positivos sobre o desempenho da memória relacionado à idade.

Para melhor compreender os efeitos benéficos do exercício físico sobre a memória demonstrados no primeiro trabalho, assim como do possível envolvimento do treinamento cognitivo sobre os parâmetros bioquímicos analisados, no **Capítulo II** estudamos o efeito do exercício físico moderado sobre a função cognitiva de ratos Wistar machos de 3, 6 e 22 meses de idade através da avaliação da memória de referência e da memória de trabalho na tarefa de Water maze, investigando também a atividade das enzimas Na^+, K^+ -ATPase e AChE no hipocampo dos ratos após o treinamento cognitivo ou após o exercício físico combinado com o treinamento cognitivo.

Estudos sugerem que o declínio cognitivo que ocorre durante envelhecimento está relacionado com alterações bioquímicas no cérebro, em especial no hipocampo (Carageorgiou *et al.*, 2008; Lovatell *et al.*, 2013; Haider *et al.*, 2014). O funcionamento adequado desta estrutura também depende de enzimas de membrana que mostram ter um papel importante para a função cognitiva, como é o caso da enzima Na^+, K^+ -ATPase (Wyse *et al.*, 2004; dos Reis-Lunardelli *et al.*, 2007). Foi demonstrado que roedores deficientes de uma isoforma específica da enzima Na^+, K^+ -ATPase apresentaram um pior desempenho da memória espacial (Moseley *et al.*, 2007). Além disso, também foi relatado que o treinamento cognitivo em tarefas de memória, como o T-maze, pode promover o aumento da atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase no hipocampo (Heo *et al.*, 2012). Além da Na^+, K^+ -ATPase, particular atenção tem sido dada a enzima AChE, especialmente devido ao envolvimento do sistema colinérgico com sintomas cognitivos observados durante o envelhecimento (Haider *et al.*, 2014).

Neste segundo Capítulo, corroborando com os resultados apresentados no Capítulo anterior, foi demonstrado que o exercício físico moderado preveniu os déficits de memória espacial de referência e de trabalho relacionados à idade. Neste estudo, também demonstramos que o treinamento cognitivo no Water maze aumentou a atividade das enzimas Na^+, K^+ -ATPase e AChE no hipocampo de ratos de 6 e 22 meses de idade. É importante ressaltar que o aumento na atividade da Na^+, K^+ -ATPase foi ainda maior nos ratos de 22 meses que foram submetidos ao exercício físico combinado com o treinamento cognitivo. Além disso, foi observada uma correlação negativa entre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase no hipocampo dos ratos de 22 meses exercitados e a latência para encontrar a plataforma no quinto dia de treino na tarefa de memória de referência, ou seja, o aumento da atividade da Na^+, K^+ -ATPase está associado com a melhora do desempenho de memória relacionado ao exercício físico nos animais envelhecidos. De acordo com esses dados, também foi observada uma correlação positiva entre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase e a diferença (delta) entre a média das latências entre os trials 1 e 4 na tarefa de memória de trabalho, demonstrando que os ratos envelhecidos exercitados apresentaram um melhor desempenho na tarefa de memória de trabalho associado com o aumento na atividade da Na^+, K^+ -ATPase.

Sabe-se que o sistema colinérgico desempenha uma importante função no cérebro durante o processo de aprendizado e memória e é o principal sistema neurotransmissor envolvido com sintomas cognitivos do envelhecimento (Hosseini-Sharifabad *et al.*, 2011; Haider *et al.*, 2014). Assim, a AChE, uma importante enzima deste sistema, tem sido muito estudada como alvo terapêutico, especialmente para o tratamento de doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer. Neste estudo foi observado

uma redução na atividade da AChE no hipocampo de ratos senescentes quando comparado aos jovens, um resultado que está de acordo com os dados da literatura e demonstram que a atividade desta enzima está diminuída no cérebro envelhecido (Carageorgiou *et al.*, 2008; Haider *et al.*, 2014). Além disso, os resultados mostram que o treinamento cognitivo aumentou a atividade da AChE no hipocampo dos ratos em todas as idades, o que pode estar relacionado com o aumento da liberação de ACh, que também ocorre como resultado do treinamento cognitivo (Ragozzino *et al.*, 1996; Stancampiano *et al.*, 1999). É possível que o treinamento cognitivo tenha melhorado a função da AChE, uma vez que foi demonstrado que o aprendizado em uma tarefa espacial modifica a função dos neurônios colinérgicos, tornando-os mais ativos (Fadda *et al.*, 2000) e também aumenta a imunorreatividade dos receptores muscarínicos (Van der Zee *et al.*, 1995). Contudo, a atividade da AChE não foi alterada pelo exercício físico combinado com o treinamento cognitivo.

Considerando as fortes correlações observadas entre o desempenho nas tarefas de memória e a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase no hipocampo dos ratos envelhecidos exercitados, podemos sugerir que o aumento da atividade desta enzima pode, pelo menos em parte, explicar a prevenção do declínio cognitivo relacionado à idade mediada pelo exercício físico.

Em linhas gerais (vide Figura 5), os resultados dos **Capítulos I e II** demonstram que o exercício físico preveniu o declínio da memória espacial relacionado à idade, um efeito provavelmente mediado por fatores que incluem a redução do estresse oxidativo, o aumento da expressão de fatores neurotróficos e o aumento da atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase no hipocampo de ratos envelhecidos.




| ATIVIDADE FÍSICA (SED/EXE) |  | |
|---|---|---|
|  | JOVEM | _____ |
| | SENESCENTE | <div> <div>↓ Memória</div> <div>↓ AChE</div> <div>↑ Espécies reativas</div> <div>↑ LPO</div> </div> |
|  | JOVEM | _____ |
| | SENESCENTE | <div> <div>↑ Memória</div> <div>↓ Espécies reativas</div> <div>↓ LPO</div> <div>↑ BDNF, IGF-1, NT-3</div> <div>↑ Na⁺,K⁺-ATPase</div> </div> |

Figura 5. Efeito do envelhecimento e do exercício físico sobre a memória, parâmetros de estado oxidativo celular, expressão de fatores neurotróficos e atividade das enzimas AChE e Na⁺,K⁺ATPase no hipocampo de ratos de 3 (jovens) e 22 meses (senescentes) de idade (LPO; lipoperoxidação).

Tendo em vista que os efeitos do envelhecimento e do exercício físico afetam o organismo como um todo, no Capítulo I desta tese avaliamos os efeitos do envelhecimento e do exercício sobre alguns parâmetros de estado oxidativo celular no hipocampo de ratos de 3 e de 22 meses e no Capítulo III decidimos investigar parâmetros semelhantes no músculo sóleo destes mesmos animais.

Os resultados demonstram que o cérebro é mais sensível do que o músculo sóleo às alterações do estado oxidativo celular relacionadas à idade, visto que foi observado um aumento no conteúdo de espécies reativas e da lipoperoxidação no hipocampo, enquanto apenas a lipoperoxidação foi aumentada no sóleo dos ratos envelhecidos. Para melhor compreender esses resultados, devemos levar em consideração as diferenças que existem entre os dois órgãos, principalmente no que se refere à proporção de biomoléculas

(especialmente de lipídeos e proteínas), estrutura celular, necessidades energéticas e tipo de metabolismo. Como cérebro é um órgão que apresenta alta taxa metabólica, são necessárias grandes quantidades de O₂ para a regeneração do ATP, que é essencial para as células neuronais (Espinet *et al.*, 2015). No entanto, esse consumo elevado de O₂ pode aumentar a geração de espécies reativas e deixar o cérebro mais susceptível ao estresse oxidativo, além de resultar no acúmulo de dano oxidativo com o envelhecimento (Farooqui and Farooqui, 2009).

Em relação aos efeitos da atividade física, sabe-se que o exercício aumenta a exigência metabólica dos músculos (Powers e Jackson, 2008). Além disso, o músculo esquelético parece ser o principal local de geração de radicais livres e espécies reativas de oxigênio durante o exercício, pois nele existem muitos sítios de geração destas espécies como a mitocôndria, o retículo sarcoplasmático e a membrana plasmática (Powers e Jackson, 2008).

Nesta tese observamos que o músculo foi mais susceptível do que o cérebro ao aumento do estresse oxidativo induzido pelo exercício físico, possivelmente devido a ação direta do exercício sobre o tecido muscular. Enquanto o protocolo de exercício físico utilizado foi benéfico para a função cognitiva de ratos envelhecidos, este mesmo protocolo de exercício levou ao aumento no conteúdo espécies reativas e da lipoperoxidação no sóleo de ratos jovens, bem como aumentou os níveis de espécies reativas no sóleo dos ratos envelhecidos (Figura 6).





| |  |  |
|---|---|---|
|  | JOVEM _____ | _____ |
| | ----- | ----- |
| | SENESCENTE ↑ Espécies reativas ↑ LPO | ↑ LPO |
|  | JOVEM _____ | ↑ Espécies reativas ↑ LPO |
| | ----- | ----- |
| | SENESCENTE ↓ Espécies reativas ↓ LPO | ↑ Espécies reativas |

Figura 6. Efeito do envelhecimento e do exercício físico sobre parâmetros de estado oxidativo celular no hipocampo e no músculo sóleo de ratos de 3 (jovens) e 22 meses (senescentes) de idade (LPO, lipoperoxidação).

Embora o cérebro, diferentemente do músculo, seja um tecido não contrátil, o aumento do metabolismo energético induzido pelo exercício parece influenciar indiretamente a função neuronal (Dishman *et al.*, 2006). Desta forma, é possível que os diferentes efeitos do exercício físico observados no cérebro e no músculo estejam relacionados ao fato de que o exercício pode induzir um aumento transitório na transcrição de genes metabólicos no músculo esquelético, conforme demonstrado por Pilegaard e colaboradores (2000) em um estudo realizado em humanos. Este aumento na transcrição de genes metabólicos pode levar à alterações no conteúdo e na atividade de enzimas oxidativas no músculo, que por sua vez, podem limitar o uso de glicose e ter efeitos indiretos no metabolismo cerebral, protegendo o cérebro do aumento das necessidades metabólicas durante e após o exercício (Pilegaard *et al.*, 2000).

Em resumo, considerando os efeitos do exercício físico moderado sobre o organismo de maneira geral, os resultados desta tese demonstram que o exercício preveniu os déficits de memória relacionados ao envelhecimento, um efeito provavelmente mediado pela redução do estresse oxidativo, pelo aumento da expressão de fatores neurotróficos e pelo aumento na atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase no hipocampo de ratos envelhecidos. Contudo, o exercício não melhorou os parâmetros avaliados no músculo sóleo dos animais envelhecidos que demonstraram melhora da função cognitiva. Em conjunto, estes dados reforçam a relevância do exercício físico como uma estratégia terapêutica não farmacológica importante para a prevenção do declínio cognitivo relacionado à idade.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta tese nos permitem concluir que:

- I. O exercício físico moderado preveniu o declínio de memória relacionado à idade na tarefa de memória de referência no Water maze, bem como preveniu o aumento no conteúdo de espécies reativas e da lipoperoxidação relacionadas à idade no hipocampo e promoveu o aumento da expressão de BDNF, NT-3 e IGF-1 no hipocampo de ratos de 22 meses de idade. A redução do estresse oxidativo pelo exercício está correlacionada com um melhor desempenho da memória nos ratos de 22 meses.
- II. O exercício físico moderado preveniu o declínio da aquisição da memória espacial de referência e de trabalho em ratos de 22 meses. O treinamento cognitivo no Water maze aumentou a atividade das enzimas Na^+ , K^+ -ATPase e AChE no hipocampo de ratos de 6 e 22 meses de idade. Os ratos de 22 meses que foram submetidos ao exercício físico combinado com o treinamento cognitivo apresentaram um aumento ainda maior na atividade da enzimas Na^+ , K^+ -ATPase no hipocampo. O aumento da atividade desta enzima está correlacionado com um melhor desempenho da memória nos ratos de 22 meses.
- III. O exercício físico moderado aumentou o conteúdo de espécies reativas e a lipoperoxidação no músculo sóleo de ratos de 3 meses. Ratos de 22 meses apresentaram aumento da lipoperoxidação e redução na atividade da CAT. O exercício induziu o aumento dos níveis de espécies reativas, redução no conteúdo de sulfidrilas e aumento de proteínas

carboniladas no sóleo dos ratos de 22 meses; contudo, promoveu o aumento da atividade das enzimas SOD e CAT. Esses dados sugerem que o músculo sóleo dos ratos de 22 meses é mais sensível do que o sóleo dos ratos de 3 meses às alterações do estado oxidativo celular induzidas pelo exercício físico.

8. PERSPECTIVAS

Investigar o efeito do exercício físico moderado sobre o sistema de defesa antioxidante não enzimático, como glutathione (GSH), potencial antioxidante total (TRAP) e reatividade antioxidante total (TAR) no músculo sóleo de ratos senescentes, bem como avaliar o efeito do exercício sobre a composição de fibras musculares no sóleo destes animais.

9. BIBLIOGRAFIA

- Acikgoz, O., Aksu, I., Topcu, A., Kayatekin, B. M. (2006) Acute exhaustive exercise does not alter lipid peroxidation levels and antioxidant enzyme activities in rat hippocampus, prefrontal cortex and striatum, *Neuroscience Letters*, 406, pp. 148–151.
- Adams, G., Haddad, F., Baldwin, K. (1994) Interaction of chronic creatine depletion and muscle unloading: effects on postural locomotor muscles', *Journal of Applied Physiology*, 77, pp. 1198–1205.
- Aebi, H. (1984) Catalase in vitro, *Methods in Enzymology*, 105, pp. 121–126.
- Ahlskog, J.E., Geda, Y.E., Graff-Radford, N.R., Petersen, R.C. (2011) Physical Exercise as a Preventive or Disease-Modifying Treatment of Dementia and Brain Aging, *Mayo Clinic Proceedings*, 86, pp. 876–884.
- Aine, C.J., Bryant, J.E., Knoefel, J.E., Adair, J.C., Hart, B., Donahue, C.H., Montañó, R., Hayek, R., Qualls, C., Ranken, D., et al. (2010) Different strategies for auditory word recognition in healthy versus normal aging, *NeuroImage*, 49, pp. 3319–3330.
- Aksenov, M.Y., Markesbery, W.R. (2001) Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease, *Neuroscience Letters*, 302, pp. 141–145.
- Aksu, I., Topcu, A., Camsari, U.M., Acikgoz, O. (2009) Effect of acute and chronic exercise on oxidant-antioxidant equilibrium in rat hippocampus, prefrontal cortex and striatum, *Neuroscience Letters*, 452, pp. 281–285.
- American College of Sports Medicine (1998) A quantidade e o tipo recomendados de exercícios para o desenvolvimento e a manutenção da aptidão cardiorrespiratória e muscular em adultos saudáveis, *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 3, pp. 96-106.
- Andersen, J.K. (2004) Oxidative stress in neurodegeneration: cause or

consequence?, *Nature Medicine*, 10, pp. S18-25.

Ang, E.T., Gomez-Pinilla, F. (2007) Potential therapeutic effects of exercise to the brain, *Current Medicinal Chemistry*, 14, pp. 2564–2571.

Araujo, D.M., Lapchak, P., Meaney, M.J., Collier, B., Quirion, R. (1990) Effects of aging on Nicotinic in the rat brain: Relationship markers and binding sites and Muscarinic to presynaptic autoreceptor cholinergic function, *The Journal of Neuroscience*, 10, pp. 3069–3078.

Arteni, N.S., Salgueiro, J., Torres, I., Achaval, M., Netto, C.A. (2003) Neonatal cerebral hypoxia-ischemia causes lateralized memory impairments in the adult rat, *Brain Research*, 973, pp. 171–178.

Astrand, P.O., Hultman, E., Juhlin-Dannfelt, A., Reynolds, G. (1986) Disposal of lactate during and after strenuous exercise in humans, *Journal of applied physiology*, 61, pp. 338–43.

Balagopal, P., Schimke, J. C., Ades, P., Adey, D., Nair, K. S. (2001) Age effect on transcript levels and synthesis rate of muscle MHC and response to resistance exercise, *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 280, pp. E203–E208.

Barbieri, E., Sestili, P. (2011) Reactive oxygen species in skeletal muscle signaling, *Journal of signal transduction*, 2012, p. 1-17.

Barstow, T., Jones, A., Nguyen, P., Casaburi, R. (1996) Influence of muscle fiber type and pedal frequency on oxygen uptake kinetics of heavy exercise, *Journal of applied physiology*, 81, pp. 1642–1650.

Bartus, R.T., Dean, R.L., Beer, B., Lippa, A.S. (1982) The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction, *Science*, 217, pp. 408–417.

Bartsch, T., Wulff, P. (2015) Editorial the hippocampus in aging and disease: from plasticity to vulnerability, *Neuroscience*, 309, pp. 1–16.

Bejma, J., Ji, L. (1999) Rapid Communication, *The American Physiological Society*, pp. 465–470.

Ben, J., Soares, F.M.S., Cechetti, F., Vuaden, F.C., Bonan, C.D., Netto, C.A., Wyse, A.T.S. (2009) Exercise effects on activities of Na⁺,K⁺-ATPase, acetylcholinesterase and adenine nucleotides hydrolysis in ovariectomized rats, *Brain Research*, 1302, pp. 248-255.

Benzi, G., Moretti, A. (1995) Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system, *Free Radical Biology and Medicine*, 19, pp. 77-101.

Berchtold, N., Chinn, G., Chou, M., Kesslak, J., Cotman C.W. (2005) Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus, *Neuroscience*, 133, pp. 853–861.

Bertoldi, K., Cechinel, L.R., Schallenberger, B., Meireles, L., Basso, C., Lovatel, G. A., Bernardi, L., Lamers, M.L., Siqueira, I.R. (2017) Aging process alters hippocampal and cortical secretase activities of Wistar rats, *Behavioural Brain Research*, 317, pp. 374–381.

Betteridge, D.J. (2000) What is oxidative stress?, *Metabolism: clinical and experimental*, 49, pp. 3–8.

Bimonte, H.A., Nelson, M.E., Granholm, A.C.E. (2003) Age-related deficits as working memory load increases: Relationships with growth factors, *Neurobiology of Aging*, 24, pp. 37–48.

Bo, H., Jiang, N., Ji, L.L., Zhang, Y. (2013) Mitochondrial redox metabolism in aging: Effect of exercise interventions, *Journal of Sport and Health Science*, 2, pp. 67–74.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding,

Analytical Biochemistry, 72, pp. 258-254.

Braith, R.W., Stewart, K.J. Resistance Exercise Training Its Role in the Prevention of Cardiovascular Disease, *Circulation*, 113:2642-2650.

Brooke, M., Kaiser, K. (1970) Three “myosin adenosine triphosphatase” systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence, *The Journal of Histochemistry and Citochemistry: Official Journal of Histochemistry Society*, 18, pp. 670–672.

Capel, F., Demaison, L., Maskouri, F., Diot, A., Buffiere, C., Mirand, P.P., Mosoni, L. (2005) Calcium overload increases oxidative stress in old rat gastrocnemius muscle, *Journal of Physiology and Pharmacology*, 56, pp. 369–380.

Carageorgiou, H., Sideris, A.C., Messari, I., Liakou, C.I., Tsakiris, S. (2008) The effects of rivastigmine plus selegiline on brain acetylcholinesterase, (Na⁺, K⁺)-, Mg²⁺- ATPase activities, antioxidant status, and learning performance of aged rats, *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 4, pp. 687–699.

Carro, E., Nuñez, A., Busiguina, S., Torres-Aleman, I. (2000) Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20, pp. 2926–2933.

Cechetti, F., Worm, P.V., Elsner, V.R., Bertoldi, K., Sanches, E., Ben, J., Siqueira, I.R., Netto, C.A. (2012) Forced treadmill exercise prevents oxidative stress and memory deficits following chronic cerebral hypoperfusion in the rat, *Neurobiology of Learning and Memory*, 97, pp. 90–96.

Coelho, F., Gobbi, S., Andreatto, C., Corazza, D., Pedroso, R., Santos-Galduro, R. (2013) Physical exercise modulates peripheral levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF): A systematic review of experimental

studies in the elderly, *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 56, pp. 10–15.

Costa, M.S., Ardais, A.P., Fioreze, G.T., Mioranza, S., Botton, P.H.S., Souza, D.O., Rocha, J.B.T., Porciúncula, L.O. (2012) The impact of the frequency of moderate exercise on memory and brain-derived neurotrophic factor signaling in young adult and middle-aged rats, *Neuroscience*, 222, pp. 100–109.

Cotman, C., Engesser-Cesar, C. (2002) Exercise enhances and protects brain function, *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 30, pp. 75–79.

Cotman, C.W., Berchtold, N.C. (2002) Exercise: A behavioral intervention to enhance brain health and plasticity, *Trends in Neurosciences*, 25, pp. 295–301.

Cotman, C.W., Berchtold, N.C., Christie, L.A. (2007) Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation, *Trends in Neurosciences*, 30, pp. 464–472.

Curtis, R., Adryan, K.M., Stark, J.L., Park, J.S., Compton, D.L., Weskamp, G., Huber, L.J., Chao, M.V., Jaenisch, R., Lee, K.F., et al. (1995) Differential role of the low affinity neurotrophin receptor (p75) in retrograde axonal transport of the neurotrophins, *Neuron*, 14, pp. 1201–1211.

Davies, K., Quintanilha, A., Brooks, G., Packer, L. (1982) Free radicals and tissue damage produced by exercise, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 107, pp. 1198–1205.

Depp, C., Jeste, D.V. (2006) Definitions and predictors of successful aging: a comprehensive review of larger quantitative studies, *The American journal of geriatric psychiatry: official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry*. American Association for Geriatric Psychiatry, 14, pp. 6–20.

Dilger, R., Johnson, R. (2008) Aging, microglial cell priming, and the discordant central inflammatory response to signals from the peripheral immune system, *Journal of leukocyte biology*, 84, pp. 932–939.

Ding, Q., Vaynman, S., Akhavan, M., Ying, Z., Gomez-Pinilla, F. (2006) Insulin-like growth factor I interfaces with brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity to modulate aspects of exercise-induced cognitive function, *Neuroscience*, 140, pp. 823–833.

Dishman, R., Berthoud, H., Booth, F., Cotman, C., Edgerton, V., Fleshner, M., Gandeia, S., Gomez-Pinilla, F., Greenwood, B., Hillman, C., et al. (2006) Neurobiology of Exercise, *Journal of Obesity*, 14, pp. 345–356.

Doherty, T. J. (2003) Invited review: Aging and sarcopenia, *Journal of applied physiology. American Physiological Society*, 95, pp. 1717–27.

Drummond, M.J., Vehrs, P.R., Schaalje, G.B., Parcell, A.C. (2005) Aerobic and resistance exercise sequence affects excess postexercise oxygen consumption, *Journal of strength and conditioning research / National Strength & Conditioning Association*, 19, pp. 332–7.

Duman, R.S. (2005) Neurotrophic factors and regulation of mood: Role of exercise, diet and metabolism, in *Neurobiology of Aging*, 26, pp. 88-93.

Gomes, E.C., Silva, A.N., de Oliveira, M.R. (2012) Oxidants, Antioxidants, and the Beneficial Roles of Exercise-Induced Production of Reactive Species, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, pp. 1–12.

Erickson, K. I., Prakash, R.S., Voss, M.W., Chaddock, L., Hu, L., Morris, K.S., White, S.M., Wójcicki, T.R., McAuley, E., Kramer, A.F. (2009) Aerobic fitness is associated with hippocampal volume in elderly humans, *Hippocampus*, 19, pp. 1030–1039.

Espinet, C., Gonzalo, H., Fleitas, C., Menal, M., Egea, J. (2015) Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Neurotrophic Approach, *Current Drug Targets*, 16, pp. 20–30.

Evans, M., Anderson, R.A., Graham, J., Ellis, G., Morris, K., Davies, S.,

Jackson, S., Lewis, M., Frenneaux, M., Rees, A. (2000) Ciprofibrate Therapy Improves Endothelial Function and Reduces Postprandial Lipemia and Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus, *Circulation*, 101, pp. 1773–1779.

Fabel, K., Fabel, K., Tam, B., Kaufer, D., Baiker, A., Simmons, N., Kuo, C. J., Palmer, T.D. (2003) VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis, *European Journal of Neuroscience*, 18, pp. 2803–2812.

Fadda, F., Cocco, S., Stancampiano, R. (2000) Hippocampal acetylcholine release correlates with spatial learning performance in freely moving rats, *Neuroreport*, 11, pp. 2265–9.

Farooqui, T., Farooqui, A.A. (2009) Aging: An important factor for the pathogenesis of neurodegenerative diseases, *Mechanisms of Ageing and Development*, 130, pp. 203–215.

Fischer, W., Sirevaag, A., Wiegand, S.J., Lindsay, R.M., Björklund, A. (1994) Reversal of spatial memory impairments in aged rats by nerve growth factor and neurotrophins 3 and 4/5 but not by brain-derived neurotrophic factor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, pp. 8607–11.

Flôres, M.F., Martins, A., Schmidt, H.L., Santos, F.W., Izquierdo, I., Mello-Carpes, P.B., Carpes, F.P. (2014) Effects of green tea and physical exercise on memory impairments associated with aging, *Neurochemistry International*, 78, pp. 53–60.

Floyd, R.A., Hensley, K. (2002) Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases, *Neurobiology of Aging*, 23, pp. 795–807.

Fraser, C.L., Arieff, A.I., Cosmo, L. (2001) Na-K-ATPase activity decreases with aging in female rat brain synaptosomes, *American journal of physiology*.

Regulatory, integrative and comparative physiology, 281, pp. 674–678.

Frontera, W.R., Suh, D., Krivickas, L.S., Hughes, V., Goldstein, R., Roubenoff, R. (2000) Skeletal muscle fiber quality in older men and women, *American journal of physiology. Cell physiology*, 279, pp. C611–C618.

Fukui, K., Omoi, N., Hayasaka, T., Shinnkai, T., Suzuki, S., Abe, K., Urano, S. (2002) Cognitive Impairment of Rats Caused by Oxidative Stress and Aging , and Its Prevention by Vitamin E, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 959, pp. 275–284.

Fukui, K., Onodera, K., Shinkai, T., Suzuki, S., Urano, S. (2001) Impairment of learning and memory in rats caused by oxidative stress and aging, and changes in antioxidative defense systems, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 928, pp. 168–75.

Gibson, G.E., Peterson, C. (1981) Aging Decreases Oxidative Metabolism and the Release and Synthesis of Acetylcholine, *Journal of Neurochemistry*, 37, pp. 978–984.

Gündüz, F., Senturk, U., Kuru, O. (2004) The effect of one year swimming exercise on oxidant stress and antioxidant capacity in aged rats, *Physiological research*, 53, pp. 171–176.

Guo, Z.H., Mattson, M.P. (2000) Neurotrophic factors protect cortical synaptic terminals against amyloid and oxidative stress-induced impairment of glucose transport, glutamate transport and mitochondrial function, *Cerebral cortex*, 10, pp. 50–7.

Haider, S., Saleem, S., Perveen, T., Tabassum, S., Batool, Z., Sadir, S., Liaquat, L., Madiha, S. (2014) Age-related learning and memory deficits in rats: role of altered brain neurotransmitters, acetylcholinesterase activity and changes in antioxidant defense system, *Age*, 36, pp. 1291–1302.

- Halliwell, B. (1991) Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease, *American Journal of Medicine*, pp. 14S–22S.
- Halliwell, B. (2012) Free radicals and antioxidants: updating a personal view, *Nutrition Reviews*, 70, pp. 257–265.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*, *Free Radical Biology and Medicine*, 10, pp. 449–450.
- Harman, D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry, *Journal of Gerontology*, 11, pp. 298–300.
- Heo, S., Csaszar, E., Jung, G., Beuk, T., Höger, H., Lubec, G. (2012) Hippocampal levels and activity of the sodium/potassium transporting ATPase subunit alpha-3 (AT1A3) are paralleling memory training in the multiple T-Maze in the C57BL/6J mouse, *Neurochemistry International*, 61, pp. 702–712.
- Hollander, J., Bejma, J., Ookawara, T., Ohno, H., Ji, L. (2000) Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: Fiber-specific effect of age, *Mechanisms of Ageing and Development*, 116, pp. 33–45.
- Hölscher, C. (2003) Time, space and hippocampal functions, *Reviews in the neurosciences*, 14, pp. 253–84.
- Hosseini-Sharifabad, A., Mohammadi-Eraghi, S., Tabrizian, K., Soodi, M., Khorshidahmad, T., Naghdi, N., Abdollahi, M., Beyer, C., Roghani, A., Sharifzadeh, M. (2011) Effects of training in the Morris water maze on the spatial learning acquisition and VAcHT expression in male rats, *DARU*, 19, pp. 166–172.
- Hung, C.W., Chen, Y.C., Hsieh, W.L., Chiou, S.H., Kao, C.L. (2010) Ageing and neurodegenerative diseases, *Ageing Research Reviews*, 9S, pp. S36–S46.
- Hunter, G.R., McCarthy, J.P., Bamman, M.M. (2004) Effects of resistance

training on older adults, *Sports Medicine*, 34, pp. 329–348.

IBGE. Projeção da População do Brasil por Sexo e Idade - 1980-2050. 2008; 24:1-94.

Jackson, M.J. (2011) Control of Reactive Oxygen Species Production in Contracting Skeletal Muscle, *Antioxidants & Redox Signaling*, 15, pp. 2477–2486.

Jenkins, R.R. (1993) Exercise, oxidative stress, and antioxidants: a review, *Int Journal of Sport Nutrition*, 3, pp. 356–75.

Ji, L. (1993) Antioxidant enzyme response to exercise and aging, *Medicine and Science in Sports and Exercise*, pp. 225–231.

Ji, L. (2008) Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: Role of redox signaling, *Free Radical Biology and Medicine*, 44, pp. 142–152.

Jolitha, A.B., Subramanyam, M.V.V., Asha Devi, S. (2009) Age-related responses of the rat cerebral cortex: Influence of vitamin E and exercise on the cholinergic system, *Biogerontology*, 10, pp. 53–63.

Jurgens, H.A., Johnson, R.W. (2012) Dysregulated neuronal-microglial cross-talk during aging, stress and inflammation, *Experimental Neurology*, 233, pp. 40–48.

Kaisho, Y., Ohta, H., Miyamoto, M., Igarashi, K. (1999) Nerve growth factor promoter driven neurotrophin-3 overexpression in the mouse and the protective effect of transgene on age-related behavioral deficits, *Neuroscience Letters*, 277, pp. 181–184.

Kim, S.E., Ko, I.G., Kim, B.K., Shin, M.S., Cho, S., Kim, C.J., Kim, S.H., Baek, S.S., Lee, E.K., Jee Yong-Seok, Y.S. (2010) Treadmill exercise prevents aging-induced failure of memory through an increase in neurogenesis and suppression of apoptosis in rat hippocampus, *Experimental Gerontology*, 45,

pp. 357–365.

Klumpp, S., Kriha, D., Bechmann, G., Maaßen, A., Maier, S., Pallast, S., Hoell, P., Josef, K. (2006) Phosphorylation of the growth factors bFGF, NGF and BDNF: A prerequisite for their biological activity, *Neurochemistry International*, 48, pp. 131–137.

Korte, M., Carroll, P., Wolf, E., Brem, G., Thoenen, H., Bonhoeffer, T. (1995) Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, pp. 8856–60.

Kramer, A.F., Erickson, K.I. (2007) Capitalizing on cortical plasticity: influence of physical activity on cognition and brain function, *Trends in Cognitive Sciences*, 11, pp. 342–348.

Kuipers, S., Bramham, C.R. (2006) Brain-derived neurotrophic factor mechanisms and function in adult synaptic plasticity: new insights and implications for therapy, *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 9, pp. 580–586.

Kukolja, J., Thiel, C.M., Wilms, M., Mirzazade, S., Fink, G.R. (2009) Ageing-related changes of neural activity associated with spatial contextual memory, *Neurobiology of Aging*, 30, pp. 630–645.

Lambertucci, R.H., Levada-Pires, A.C., Rossoni, L.V., Curi, R., Pithon-Curi, T.C. (2007) Effects of aerobic exercise training on antioxidant enzyme activities and mRNA levels in soleus muscle from young and aged rats, *Mechanisms of Ageing and Development*, 128, pp. 267–275.

Larsen, J.O., Skalicky, M., Viidik, A. (2000) Does long-term physical exercise counteract age-related Purkinje cell loss? A stereological study of rat cerebellum, *Journal of Comparative Neurology*, 428, pp. 213–222.

- LeBel, C.P., Ischiropoulos, H., Bondy, S.C. (1992) Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress, *Chemical research in toxicology*, 5, pp. 227–231.
- Lee, C.H., Hwang, I.K., Choi, J.H., Yoo, K.Y., Park, O.K., Huh, S.O., Lee, Y.L., Shin, H.C., Won, M.H. (2010) Age-dependent changes in calretinin immunoreactivity and its protein level in the gerbil hippocampus, *Neurochemical Research*, 35, pp. 122–129.
- Leeds, P., Leng, Y., Chalecka-Franaszek, E. and Chuang, D.M. (2005) Neurotrophins protect against cytosine arabinoside-induced apoptosis of immature rat cerebellar neurons, *Neurochemistry International*, 46, pp. 61–72.
- Liochev, S. (2013) Reactive oxygen species and the free radical theory of aging, *Free Radical Biology and Medicine*, 60, pp. 1–4.
- Lopez-Lopez, C., LeRoith, D., Torres-Aleman, I. (2004) Insulin-like growth factor I is required for vessel remodeling in the adult brain, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, pp. 9833–9838.
- Lovatel, G.A., Elsner, V.R., Bertoldi, K., Vanzella, C., Moysés, F. dos S., Vizuite, A., Spindler, C., Cechinel, L.R., Netto, C.A., Muotri, A.R., et al. (2013) Treadmill exercise induces age-related changes in aversive memory, Neuroinflammatory and epigenetic processes in the rat hippocampus, *Neurobiology of Learning and Memory*, 101, pp. 94–102.
- Lu, B., Chow, A. (1999) Neurotrophins and hippocampal synaptic transmission and plasticity', *Journal of Neuroscience Research*, 58, pp. 76–87.
- Macaluso, A., De Vito, G. (2004) Muscle strength, power and adaptations to resistance training in older people, *European Journal of Applied Physiology*, pp. 450–472.

Marklund, S.L. (1985) Superoxide dismutase isoenzymes in tissues and plasma from New Zealand black mice, nude mice and normal BALB/c mice, *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 148, pp. 129–134.

Martin, I., Grotewiel, M.S. (2006) Oxidative damage and age-related functional declines, 127, pp. 411–423.

McArdle, A., Dillmann, W.H., Mestril, R., Faulkner, J.A., Jackson, M.J. (2004) Overexpression of HSP70 in mouse skeletal muscle protects against muscle damage and age-related muscle dysfunction, *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18, pp. 355–357.

Meneses, A. (1999) 5-HT system and cognition, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, pp. 1111–1125.

Menshikova, E.V, Ritov, V.B., Ferrell, R.E., Azuma, K., Goodpaster, B.H., Kelley, D.E. (2007) Characteristics of skeletal muscle mitochondrial biogenesis induced by moderate-intensity exercise and weight loss in obesity, *Journal of applied physiology*, 103, pp. 21–27.

Migliore, L., Coppedè, F. (2009) Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging, *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674, pp. 73–84.

Mitchell, W.K., Williams, J., Atherton, P., Larvin, M., Lund, J., Narici, M. (2012) Sarcopenia, dynapenia, and the impact of advancing age on human skeletal muscle size and strength; a quantitative review, *Frontiers in Physiology*, 3, pp. 1–18.

Moffat, S.D., Elkins, W., Resnick, S.M. (2006) Age differences in the neural systems supporting human allocentric spatial navigation, *Neurobiology of Aging*,

27, pp. 965–972.

Moraska, A., Deak, T., Spencer, R.L., Roth, D., Fleshner, M. (2000) Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats, *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 279, pp. R1321-R1329.

Morth, J., Pedersen, B., Buch-Pedersen, M., Andersen, J., Vilsen, B., Palmgren, M., Nissen, P. (2011) A structural overview of the plasma membrane Na⁺,K⁺-ATPase and H⁺-ATPase ion pumps, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12, pp. 60–70.

Moseley, A.E., Williams, M.T., Schaefer, T.L., Bohanan, C.S., Neumann, J.C., Behbehani, M.M., Vorhees, C.V., Lingrel, J.B. (2007) Deficiency in Na⁺,K⁺-ATPase alpha Isoform Genes Alters Spatial Learning, Motor Activity, and Anxiety in Mice, *The Journal of Neuroscience*, 27, pp. 616–626.

Mulero, J., Zafrilla, P., Martinez-Cacha, A. (2011) Oxidative stress, frailty and cognitive decline, *The Journal of nutrition, Health & Aging*, 15, pp. 756-760.

Nakata, H., Nakamura, S. (2007) Brain-derived neurotrophic factor regulates AMPA receptor trafficking to post-synaptic densities via IP3R and TRPC calcium signaling, *FEBS Letters*, 581, pp. 2047–2054.

Narath, E., Skalicky, M., Viidik, A. (2001) Voluntary and forced exercise influence the survival and body composition of ageing male rats differently, *Experimental Gerontology*, 36, pp. 1699–1711.

Neeper, S., Gómez-Pinilla, F., Choic, J., Cotman, C. (1996) Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain, *Brain Research*, 726, pp. 49–56.

O'Callaghan, R.M., Ohle, R., Kelly, A.M. (2007) The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: A comparison of LTP, spatial- and non-

- spatial learning, *Behavioural Brain Research*, 176, pp. 362–366.
- O'Keefe, J., Nadel, L. (1979) The hippocampus as a cognitive map, *Behavioral and Brain Sciences*, 2, pp. 487–494.
- Oh-Ishi, S., Takako, K., Hitoshi, Y., Naokazu, N., Keiichiro, S., Naoyuki, T., Hideki, O. (1995) Alterations of Superoxide Dismutase Iso-Enzyme Activity, Content, and mRNA Expression With Aging in Rat Skeletal Muscle, *Mechanisms of Ageing and Development*, 84, pp. 65–76.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Analytical Biochemistry*, 95, pp. 351–358.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., Nicotera, P. (2003) Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4, pp. 552–565.
- Papandreou, M. A., Tsachaki, M., Efthimiopoulos, S., Cordopatis, P., Lamari, F. N., Margarity, M. (2011) Memory enhancing effects of saffron in aged mice are correlated with antioxidant protection, *Behavioural Brain Research*, 219, pp. 197–204.
- Paradies, G., Petrosillo, G., Paradies, V., Ruggiero, F.M. (2011) Mitochondrial dysfunction in brain aging: role of oxidative stress and cardiolipin, *Neurochemistry International*, 58, pp. 447–457.
- Peters, R. (2006) Ageing and the brain, *Postgraduate medical journal*, 82, pp. 84–8.
- Pietá Dias, C., Martins de Lima, M.N., Presti-Torres, J., Dornelles, A., Garcia, V. A., Siciliani Scalco, F., Rewsaat Guimarães, M., Constantino, L., Budni, P., Dal-Pizzol, F., Schröder, N. (2007) Memantine reduces oxidative damage and enhances long-term recognition memory in aged rats, *Neuroscience*, 146, pp. 1719–1725.
- Pilegaard, H., Ordway, G., Saltin, B., Neufer, P. (2000) Transcriptional

regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise, *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 279, pp. E806–E814.

Pingitore, A., Lima, G.P.P., Mastorci, F., Quinones, A., Iervasi, G., Vassalle, C. (2015) Exercise and oxidative stress: Potential effects of antioxidant dietary strategies in sports, *Nutrition*, 31, pp. 916–922.

Pinho, R., Andrades, M., Oliveira, M., Pirola, A., Zago, M., Silveira, P., Dal-Pizzol, F., Moreira, J. (2006) Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise, *Cell Biology International*, 30, pp. 848–853.

Porter, M., Vandervoort, A. and Lexell, J. (1995) Aging of human muscle: structure, function and adaptability, *Scandinavian Journal of Medicine and Science*, 5, pp. 129–142.

Powers, S., Jackson, M. (2008) Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production, *Physiological reviews*, 88, pp. 1243–1276.

Powers, S.K., Criswell, D., Lawler, J., Ji, L.L., Martin, D., Herb, R.A., Dudley, G. (1994) Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle, *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 266, pp. R375–R380.

Pringle, A.K., Sundstrom, L.E., Wilde, G.J.C., Williams, L.R., Iannotti F. (1996) Brain-derived neurotrophic factor, but not neurotrophin-3, prevents ischaemia-induced neuronal cell death in organotypic rat hippocampal slice cultures, *Neuroscience Letters*, 211, pp. 203–206.

Van Praag, H. (2009) Exercise and the brain: something to chew on, *Trends in Neuroscience*, 32, pp. 283–290.

- Van Praag, H., Shubert, T., Zhao, C., Gage, F.H. (2005) Exercise Enhances Learning and Hippocampal Neurogenesis in Aged Mice, *Journal of Neuroscience*, 25, pp. 8680–8685.
- Radák, Z., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., Pucsok, J., Sasvári, M., Nyakas, C., Goto, S. (2001) Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain, *Neurochemistry international*, 38, pp. 17–23.
- Radák, Z., Pucsok, J., Mecseki, S., Csont, T., Ferdinandy, P. (1999) Muscle soreness-induced reduction in force generation is accompanied by increased nitric oxide content and DNA damage in human skeletal muscle, *Free Radical Biology and Medicine*, 26, pp. 1059–1063.
- Radak, Z., Toldy, A., Szabo, Z., Siamilis, S., Nyakas, C., Silye, G., Jakus, J., Goto, S. (2006) The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain, *Neurochemistry International*, 49, pp. 387–392.
- Ragozzino, M.E., Unick, K.E., Goldt, P.E., Mcgaugh, J.L. (1996) Hippocampal acetylcholine release during memory testing in rats: Augmentation by glucose, *Psychology*, 93, pp. 4693–4698.
- Rasmussen, P., Brassard, P., Adser, H., Pedersen, M.V, Leick, L., Hart, E., Secher, N.H., Pedersen, B.K., Pilegaard, H. (2009) Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise, *Experimental physiology*, 94, pp. 1062–1069.
- Raz, N., Lindenberger, U., Rodrigue, K.M., Kennedy, K.M., Head, D., Williamson, A., Dahle, C., Gerstorf, D., Acker, J.D. (2005) Regional brain changes in aging healthy adults: General trends, individual differences and modifiers, *Cerebral Cortex*, 15, pp. 1676–1689.

- Reichardt, L.F. (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways, *Philosophical Transactional of the Royal Society*, 361, pp. 1545–1564.
- Reid, K.J., Baron, K.G., Lu, B., Naylor, E., Wolfe, L., Zee, P.C. Aerobic exercise improves self-reported sleep and quality of life in older adults with insomnia, *Sleep Medicine*, 11, pp. 934-940.
- dos Reis-Lunardelli, E., Castro, C., Bavaresco, C., Coitinho, A., da Trindade, L., Perrenoud, M., Roesler R,S.J., de Souza Wyse, A., Izquierdo, I. (2007) Effects of thyroid hormones on memory and on Na(+), K(+)-ATPase activity in rat brain, *Current neurovascular research*, 4, pp. 184–193.
- dos Reis, E.A., De Oliveira, L.S., Lamers, M.L., Netto, C.A., Wyse, A.T.S. (2002) Arginine administration inhibits hippocampal Na⁺,K⁺-ATPase activity and impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats, *Brain Research*, 951, pp. 151–157.
- Reznick, A., Witt, E., Matsumoto, M., Packer, L. (1992) Vitamin E inhibits protein oxidation in skeletal muscle of resting and exercised rats, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 189, pp. 801–806.
- Rosenzweig, E.S., Barnes, C.A. (2003) Impact of aging on hippocampal function: Plasticity, network dynamics, and cognition, *Progress in Neurobiology*, pp. 143–179.
- Russell, J.C., Epling, W.F., Pierce, D., Amy, R.M. (1987) Induction of voluntary prolonged running by rats, *Journal of Applied Physiology*, 63, pp. 2549–2553.
- Russo-Neustadt, A., Chen, M. (2005) Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant activity, *Current Pharmaceutical Design*, 11, pp. 1495–1510.
- Salehi, A., Delcroix, J.D., Mobley, W.C. (2003) Traffic at the intersection of neurotrophic factor signaling and neurodegeneration, *Trends in Neurosciences*, 26, pp. 73–80.

- Salehi, A., Delcroix, J.D., Swaab, D.F. (2004) Alzheimer's disease and NGF signaling, *Journal of Neural Transmission*, 111, pp. 323–345.
- Sampedro-Piquero, P., Zancada-Menendez, C., Begega, A., Mendez, M. and Arias, J.L. (2013) Effects of forced exercise on spatial memory and cytochrome c oxidase activity in aged rats, *Brain Research*, 1502, pp. 20–29.
- Sanz, N., Díez-Fernández, C., Alvarez, A., Cascales, M. (1997) Age-dependent modifications in rat hepatocyte antioxidant defense systems, *Journal of Hepatology*, 27, pp. 525–534.
- Savitha, S., Tamilselvan, J., Anusuyadevi, M., Panneerselvam, C. (2005) Oxidative stress on mitochondrial antioxidant defense system in the aging process: Role of DL- α -lipoic acid and L-carnitine, *Clinica Chimica Acta*, 355, pp. 173–180.
- Scarmeas, N., Luchsinger, J.A., Brickman, A.M., Cosentino, S., Tang, M.X., Stern, Y. (2009) Physical activity, diet, and risk of Alzheimer disease, *JAMA*, 302, pp. 627–637.
- Schiaffino, S., Reggiani, C. (2011) Fiber types in mammalian skeletal muscles, *Physiological reviews*, 91, pp. 1447–531.
- Schliebs, R., Arendt, T. (2011) The cholinergic system in aging and neuronal degeneration, *Behavioural Brain Research*, 221, pp. 555-563.
- Scopel, D., Fochesatto, C., Cimarosti, H., Rabbo, M., Belló-Klein, A., Salbego, C., Netto, C.A., Siqueira, I.R. (2006) Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation, *Brain Research Bulletin*, 71, pp. 155–159.
- Sengupta, P. (2013) The laboratory rat: Relating its age with human's, *International Journal of Preventive Medicine*, pp. 624–630.
- Serrano, F., Klann, E. (2004) Reactive oxygen species and synaptic plasticity in

the aging hippocampus, *Ageing Research Reviews*, 3, pp. 431-443.

Siqueira, I. R., Fochesatto, C., De Andrade, A., Santos, M., Hagen, M., Bello-Klein, A., Netto, C.A. (2005) Total antioxidant capacity is impaired in different structures from aged rat brain, *International Journal of Developmental Neuroscience*, 23, pp. 663–671.

Socci, D.J., Sanberg, P.R., Arendash, G.W. (1995) Nicotine Enhances Morris Water Maze Performance of Young and Aged Rats, *Neurobiology of Aging*, 16, pp. 857–860.

Stadtman, E., Levine, R. (2003) Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins, *Amino Acids*, 25, pp. 207–218.

Stancampiano, R., Cocco, S., Cugusi, C., Sarais, L., Fadda, F. (1999) Serotonin and acetylcholine release response in the rat hippocampus during a spatial memory task, *Neuroscience*, 89, pp. 1135–1143.

Szczesny, B., Tann, A., Mitra, S. (2010) Age- and tissue-specific changes in mitochondrial and nuclear DNA base excision repair activity in mice: susceptibility of skeletal muscles to oxidative injury, *Mechanisms of Ageing and Development*, 144, pp. 724–732.

Szuhany, K., Bugatti, M., Otto, M., (2015) A meta-analytic review of the effects of exercise on brain- derived neurotrophic factor, *Journal of Psychiatric Research*, 60, pp. 56–64.

Szulc, P., Beck, T.J., Delmas, P.D. (2005) Low Skeletal Muscle Mass Is Associated With Poor Structural Parameters of Bone and Impaired Balance in Elderly Men, *Journal of Bone and Mineral Research*, 20, pp. 721-729.

Taridi, N.M., Rani, N.A., Latiff, A.A., Ngah, W.Z.W., Mazlan, M. (2014) Tocotrienol Rich Fraction Reverses Age-Related Deficits in Spatial Learning and Memory in Aged Rats, *Lipids*, 49, pp. 855–869.

- Tiana, L., Caib, Q., Wei, H. (1998) Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging, *Free Radical Biology and Medicine*, 24, pp. 1477–1484.
- Trejo, J.L., Carro, E., Torres-Alemá, I. (2001) Circulating Insulin-Like Growth Factor I Mediates Exercise-Induced Increases in the Number of New Neurons in the Adult Hippocampus, *The Journal of Neuroscience*, 21, pp. 1628–1634.
- Tromm, C.B., Pozzi, B.G., Paganini, C.S., Marques, S.O., Pedroso, G.S., Souza, P.S., Silveira, P.C.L., Silva, L.A., De Souza, C.T., Pinho, R.A. (2016) The role of continuous versus fractionated physical training on muscle oxidative stress parameters and calcium-handling proteins in aged rats, *Aging Clinical and Experimental Research*, 28, pp. 833–841.
- Vannucchi, H., Moreira, E.A.M., Cunha, D.F., Junqueira-Franco, M.V.M., Bernardes, M.M., Jordão-Jr, A.A. (1998) Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante, *Medicina*, 31, pp. 31–44.
- Vasilaki, A., Mansouri, A., Van Remmen, H., van der Meulen, J., Larkin, L., Richardson, A., McArdle, A., Faulkner, J., Jackson, M., Kizaki, T., et al. (2006) Alterations of superoxide dismutase iso-enzyme activity, content, and mRNA expression with aging in rat skeletal muscle, *Aging Cell*, 5, pp. 109–117.
- Vassalle, C., Pingitore, A., De Giuseppe, R., Vigna, L.B.F. (2015) Biomarkers to estimate bioefficacy of dietary/supplemental antioxidants in sports, *Antioxidants in sport nutrition*, pp. 255–272.
- Villanueva, R. (2013) Neurobiology of Major Depressive Disorder, *Neural Plasticity*, 2013, pp. 1-7.
- Wendel, A. (1981) *Glutathione peroxidase*, *Methods in Enzymology*, 77, pp. 325-333.
- Weuve, J., Kang, J.H., Manson, J.E., Breteler, M.M.B., Ware, J.H. and

Grodstein, F. (2004) Physical activity, including walking, and cognitive function in older women, *JAMA*, 292, pp. 1454–1461.

Witt, E.H., Reznick, Z., Viguie, C., Starke-Reed, P., Packer, L. (1992) Exercise, oxidative damage and effects of antioxidant manipulation, *The Journal of nutrition*, 122, pp. 766–773.

Wyse, A.T.S., Bavaresco, C.S., Reis, E.A., Zugno, A.I., Tagliari, B., Calcagnotto, T., Netto, C.A. (2004) Training in inhibitory avoidance causes a reduction of Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampus, *Physiology & Behavior*, 80, pp. 475–479.

Van der Zee, E.A., Compaan, J.C., Bohus, B., Luiten, P.G.M. (1995) Alterations in the immunoreactivity for muscarinic acetylcholine receptors and colocalized PKC in mouse hippocampus induced by spatial discrimination learning, *Hippocampus*, 5, pp. 349–362.

Zhang, Q., Wu, Y., Zhang, P., Sha, H., Jia, J., Hu, Y., Zhu, J. (2012) Exercise induces mitochondrial biogenesis after brain ischemia in rats, *Neuroscience*, 205, pp. 10–17.